



# Fossilisation expérimentale de bactéries : appui à l'identification de signatures microbiologiques terrestres et extraterrestres

François Orange

## ► To cite this version:

François Orange. Fossilisation expérimentale de bactéries : appui à l'identification de signatures microbiologiques terrestres et extraterrestres. Géologie appliquée. Université d'Orléans, 2008. Français. NNT : . tel-00322744

**HAL Id: tel-00322744**

**<https://theses.hal.science/tel-00322744>**

Submitted on 18 Sep 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES*  
*CENTRE DE BIOPHYSIQUE MOLÉCULAIRE*  
*INSTITUT DES SCIENCES DE LA TERRE D'ORLÉANS*

## THÈSE

présentée par :

**François ORANGE**

soutenue le : **20 juin 2008**

pour obtenir le grade de :

**Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Paléontologie

**Fossilisation expérimentale de bactéries :  
appui à l'identification de signatures  
microbiologiques terrestres et extraterrestres**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme Frances WESTALL**  
**M. Jean-Robert DISNAR**

Directeur de recherche, CNRS, CBM, Orléans  
Directeur de recherche, ISTO, CNRS, Orléans

**RAPPORTEURS :**

**Mme Danielle FORTIN**  
**M. Eric VERRECCHIA**

Professeur, Université d'Ottawa (Canada)  
Professeur, Université de Neuchâtel (Suisse)

---

**JURY :**

**Mme Frances WESTALL**  
**M. Jean-Robert DISNAR**  
**Mme Danielle FORTIN**  
**M. Eric VERRECCHIA**  
**M. Ary BRUAND**  
**M. Christian MUSTIN**

Directeur de recherche, CNRS, CBM, Orléans  
Directeur de recherche, ISTO, CNRS, Orléans  
Professeur, Université d'Ottawa (Canada)  
Professeur, Université de Neuchâtel (Suisse)  
Professeur, ISTO, Université d'Orléans  
Chargé de recherche, LIMOS, Université Henri Poincaré – Nancy I



*A la mémoire de Michel Lepiller,  
qui m'a permis de faire mes premiers pas  
dans le monde de la recherche.*

## **Remerciements**

*« Pour un tel inventaire, il faudrait un Prévert »*

Ce manuscrit est le fruit d'un travail réalisé au Centre de Biophysique Moléculaire et à l'Institut des Sciences de la Terre d'Orléans, au sein de l'Observatoire des Sciences de l'Univers en Région Centre, avec un financement du CNRS, sous les directions de Jean-Claude Beloeil, Elisabeth Vergès et Ary Bruand, qui m'ont accueilli et permis de faire cette thèse dans leurs laboratoires.

Durant ces quatre années, j'ai donc eu la grande chance de faire partie de deux laboratoires, ce qui a multiplié le nombre de rencontres enrichissantes.

Tout d'abord mes remerciements vont à mes deux directeurs de thèse, Frances Westall et Jean-Robert Disnar pour leurs continuels soutiens et conseils.

Je remercie ensuite mes deux « familles », celle de l'équipe Exobiologie du CBM (Philippe Labrot, Marylène Bertrand, André Brack, Frédéric Foucher, Loïc Salmon, Annie Chabin), mais aussi celle de l'équipe Matière Organique de l'ISTO (Christian Di Giovanni, Jérémy Jacob, Marcio Gurgel, Laure Comont, Yann Graz, Christian Défarge, Fatima Laggoun-Défarge, Xavier Bourrat, Aurore Dissaux, Mohammed Boussafir, Jean Trichet, Patrick Albéric).

Parmi eux, un merci tout particulier pour celles et ceux qui m'ont accompagné et soutenu tout au long de la fin de cette thèse : Yann-Vaï Le Bihan, Romy Honorine, Olivier Lamiable, Frédérique Jacquinet, Makhlof Rabhi, Anne-Sophie Fougeron, Damien Le Minoux, Aurélie Tchalikian. Leur compagnie a été une aide très précieuse.

Les personnes du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes de Brest pourraient former une troisième famille. Tous mes remerciements à Daniel Prieur, Mathieu Gonnet, Marc Le Romancer, Jean-Louis Birrien, Claire Geslin, Olivier Le Goff et Stéphane l'Haridon pour leur accueil, et leur gentillesse.

Sans la participation de Valentin Crépeau et de Mathieu Fournier, stagiaires de M1, les résultats de cette thèse seraient réduits à peau de chagrin. Les deux mois que j'ai passé avec chacun d'eux comptent parmi les meilleurs moments de ces quatre années.

Avec une thématique jonglant entre plusieurs disciplines, cette étude n'aurait non plus pas été possible sans les connaissances et l'assistance de nombreuses personnes, d'Orléans ou d'ailleurs : Nadège Bienvenu, Pascale Gautret, Aude Durand, Nathalie Lottier, Patrick Baillif, Michel Pichavant, Jan Toporski, Nancy Hinman.

Les nombreuses images en microscopie électronique doivent beaucoup à Annie Richard, Dominique Jalabert et Caroline Andreazza du Centre de Microscopie Electronique de l'Université d'Orléans, où il fait bon se réfugier quand la canicule sévit dehors.

Merci à tous les thésards que j'ai pu croiser en ces différents endroits : Mathieu Gautier, Mai-Julie Nguyen, Isidore Decostaire, Gaëlle-Anne Cremer, Céline Walmacq, Sébastien Jégo, Oumarou Samna Soumana, Corinne Buré, Sonia Mazier, Pauline Robinet, Ibai Valverde, Khalifa El Dursi, Yann Bilbille, et tout particulièrement à ceux de ma promotion de DEA, Pierre Trap, Priscille Lesne, Jérôme Gouin et Aurore Joly, qui m'ont battu à plates coutures dans la course à la soutenance.

De gros mercis à mes parents, à ma sœur, et au reste de ma famille, pour leur soutien sans faille et leurs encouragements.

Milles remerciements aux nombreuses cellules de *M. jannaschii*, *P. abyssi*, *Rhodovulum sp.*, *Geobacillus sp.* et *C. aurantiacus* pour leur participation bénévole à cette étude.

Enfin, un merci tout particulier à Paul, John, George et Ringo, ainsi qu'à tous leurs successeurs.

# Table des Matières

<b>Première partie : Introduction.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. A la recherche des plus anciennes traces de vie.....</b>	<b>8</b>
1.1.1. Généralités.....	8
1.1.2. Controverses concernant l'identification de microfossiles.....	9
1.1.2.1. La controverse sur les microfossiles d'Apex (3.465 Ga).....	10
1.1.2.2. La controverse sur les traces de vie fossiles dans la météorite martienne ALH 84001.....	11
1.1.3. Les micro-organismes fossiles.....	13
1.1.3.1. Inventaire des formations fossilifères et des fossiles découverts.....	13
1.1.3.2. Traces de vie et méthodes de détection.....	17
1.1.3.3. Mode de préservation des micro-organismes primitifs.....	19
<b>1.2. La fossilisation expérimentale comme aide à la compréhension de la fossilisation naturelle.....</b>	<b>20</b>
1.2.1. La fossilisation expérimentale.....	20
1.2.1.1. Les précédentes fossilisations expérimentales.....	20
1.2.1.2. Ce qu'elles nous ont appris.....	21
1.2.2. Les moyens d'améliorer notre connaissance de la fossilisation.....	23
1.2.3. Conclusions, problématique générale et objectifs.....	24
<b>1.3. Micro-organismes analogues des formes de vie primitives, et sélection des espèces à étudier.....</b>	<b>25</b>
1.3.1. Ce que l'on sait des premières formes de vie.....	25
1.3.2. Micro-organismes analogues des formes de vie primitives.....	26
1.3.2.1. Les Archées – Un domaine particulier du vivant.....	26
1.3.2.2. Intérêt pour les photosynthétiques anoxygéniques.....	27
1.3.3. Critères pour le choix des micro-organismes.....	29
<b>1.4. Evolution de la démarche au cours de cette étude.....</b>	<b>32</b>
<b>Seconde partie : Matériels et Méthodes.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1. Souches microbiennes utilisées.....</b>	<b>36</b>
2.1.1. Présentation des différentes souches de micro-organismes utilisées pour la fossilisation expérimentale.....	36
2.1.1.1. Methanocaldococcus jannaschii (Archée méthanogène hyperthermophile).....	36
2.1.1.2. Pyrococcus abyssi (Archée hyperthermophile).....	37
2.1.1.3. Chloroflexus aurantiacus (Bactérie filamenteuse, photosynthétique anoxygénique).....	38
2.1.1.4. Geobacillus sp. (Bactérie thermophile Gram-positive).....	39
2.1.1.5. Rhodovulum sp. (Bactérie Gram-négative, non thermophile).....	39
2.1.2. Culture des micro-organismes.....	40
2.1.2.1. Culture des Archées hyperthermophiles, en anaérobiose.....	40
2.1.2.2. Culture des autres micro-organismes.....	43
2.1.3. Prélèvement de tapis bactériens à Octopus Spring (Parc National de Yellowstone).....	44
2.1.3.1. Description de la source.....	44
2.1.3.2. Choix des points de prélèvements.....	47
2.1.3.3. Prélèvements.....	48
<b>2.2. Modes opératoires de la silicification expérimentale.....</b>	<b>49</b>
2.2.1. Agent silicifiant.....	49
2.2.2. Mise en contact des micro-organismes avec une solution saturée de silice.....	50
2.2.2.1. Silicification expérimentale dans le milieu de culture à une concentration de 500 ppm de silice.....	50
2.2.2.2. Variations du mode opératoire.....	53
2.2.3. Incubation.....	55
2.2.4. Prélèvement et fin de la fossilisation.....	55
2.2.4.1. Dans le cas d'une fossilisation dans le milieu de culture originel.....	55
2.2.4.2. Cas de la fossilisation dans une solution de silice pure.....	56

2.2.4.3. Cas des tapis microbiens prélevés à Octopus Spring .....	56
2.2.4.4. Lyophilisation pour les analyses chimiques.....	56
<b>2.3 Microscopie électronique.....</b>	<b>57</b>
2.3.1. Microscopie électronique à balayage (MEB).....	57
2.3.1.1. Principes, particularités, apports spécifiques.....	57
2.3.1.2. Préparation des échantillons.....	58
2.3.2. Microscopie Electronique en Transmission.....	60
2.3.2.1. Principes, particularités, apports spécifiques.....	60
2.3.2.2. Préparation des échantillons.....	60
<b>2.4. Adsorption et fixation d'ions métalliques par <i>M. jannaschii</i>.....</b>	<b>62</b>
2.4.1. Culture des micro-organismes, et fixation des ions métalliques.....	63
2.4.2. Analyse par spectrométrie à absorption atomique.....	64
2.4.3. Microscopie Electronique en Transmission.....	65
2.4.4. Fixation de fer suivie d'une silicification.....	66
<b>2.5. Analyse de la matière organique durant la fossilisation de <i>M. jannaschii</i>.....</b>	<b>66</b>
2.5.1. Séparation des EPS et des cellules.....	67
2.5.2. Analyse des acides aminés.....	67
2.5.2.1. Echantillons préparés.....	67
2.5.2.2. Protocole expérimental.....	68
2.5.2.3. Chromatographie .....	69
2.5.3. Analyse des sucres.....	69
2.5.3.1. Echantillons préparés.....	69
2.5.3.2. Protocole expérimental.....	70
2.5.3.3. Chromatographie en phase gazeuse.....	70
2.5.4. Analyse des lipides.....	71
2.5.4.1. Echantillons préparés.....	71
2.5.4.2. Protocoles expérimentaux.....	72
2.5.4.3. Chromatographie – Spectrométrie de masse (GC-MS).....	74
<b>Troisième partie : Résultats.....</b>	<b>76</b>
<b>3.1. Fossilisation expérimentale d'Archées hyperthermophiles.....</b>	<b>76</b>
3.1.1. Silicification expérimentale de <i>P. abyssi</i> .....	76
3.1.2. Silicification expérimentale de <i>M. jannaschii</i> .....	84
3.1.3. Echantillons témoins, sans micro-organismes.....	91
<b>3.2. Fossilisation expérimentale de Bactéries.....</b>	<b>92</b>
3.2.1 Silicification expérimentale de <i>Rhodovulum sp</i> .....	92
3.2.1.1. Silicification à température ambiante.....	92
3.2.1.2. Silicification à 60°C.....	97
3.2.2 Silicification expérimentale de <i>Geobacillus sp</i> .....	98
<b>3.3. Variations du mode opératoire.....</b>	<b>102</b>
3.3.1. Fossilisation expérimentale de différents micro-organismes dans une solution de silice pure.....	102
3.3.1.1. Methanocaldococcus jannaschii.....	103
3.3.1.2. Pyrococcus abyssi.....	103
3.3.1.3. Rhodovulum sp.....	105
3.3.2. Fossilisation expérimentale à une concentration de silice de 5000 ppm.....	105
3.3.2.1. Methanocaldococcus jannaschii.....	105
3.3.2.2. Pyrococcus abyssi.....	106
<b>3.4. Adsorption et fixation d'ions métalliques par <i>M. jannaschii</i>.....</b>	<b>111</b>
3.4.1. Mesure de l'immobilisation de métaux par les micro-organismes par spectrométrie d'absorption atomique.....	111
3.4.2. Observations en Microscopie Electronique en Transmission.....	112
3.4.2.1. Fixation de Fer.....	113
3.4.2.2. Fixation de Plomb.....	114
3.4.2.3. Fixation de Calcium.....	117
3.4.2.4. Fixation de Cuivre.....	117
3.4.2.5. Fixation de Zinc .....	117

3.4.2.6. Bilan.....	118
3.4.3. Fixation de fer suivie de silicification.....	118
<b>3.5. Fossilisation expérimentale des tapis microbiens d'Octopus Spring (Yellowstone).....</b>	<b>119</b>
3.5.1. Constatations générales et observations en microscopie optique des tapis bactériens.....	119
3.5.1.1. Observation en microscopie optique.....	119
3.5.1.2. Suivi des tapis au cours de la fossilisation.....	121
3.5.2. Fossilisation expérimentale d'un tapis microbien vivant.....	123
3.5.2.1. Aspect naturel du tapis à Chloroflexus du Site n°3.....	123
3.5.2.2. Fossilisation du tapis à Chloroflexus du site n°3.....	124
3.5.3. Fossilisation expérimentale d'un tapis microbien moribond.....	133
3.5.3.1. Aspect naturel du tapis à Chloroflexus des sites n°1 et n°2.....	134
3.5.3.2. Fossilisation du tapis à Chloroflexus des sites n° 1 et n°2.....	135
3.5.3.3. Aspect naturel et fossilisation du tapis à Synechococcus du site n°1.....	143
3.5.4. Sinter.....	146
<b>3.6. Devenir de la matière organique durant de la fossilisation expérimentale de <i>M. jannaschii</i>.....</b>	<b>147</b>
3.6.1. Remarques préliminaires.....	147
3.6.2. Analyse des acides aminés durant la fossilisation de <i>M. jannaschii</i> .....	148
3.6.2.1. Composition en acides aminés d'une culture non fossilisée.....	149
3.6.2.2. Evolution de la composition en acides aminés au cours de la fossilisation.....	151
3.6.3. Analyses des sucres durant la fossilisation de <i>M. jannaschii</i> .....	158
3.6.3.1. Composition en sucres d'une culture de <i>M. jannaschii</i> .....	158
3.6.3.2. Evolution des masses totales de monosaccharides analysés durant la fossilisation expérimentale.....	159
3.6.3.3. Suivi du glucose et du mannose au cours de la fossilisation expérimentale.....	160
3.6.4. Analyses des acides gras durant la fossilisation de <i>M. jannaschii</i> .....	162
3.6.4.1. Identification des composés et quantification à partir du chromatogramme.....	162
3.6.4.1. Composition en acides gras d'une culture non fossilisée de <i>M. jannaschii</i> .....	163
3.6.4.2. Evolution de la composition en acides gras au cours de la fossilisation.....	166
3.6.5. Analyses des alcanes.....	174
3.6.6. Analyses des lipides membranaires.....	174
<b>Quatrième partie : Discussion.....</b>	<b>175</b>
<b>4.1. Fossilisation expérimentale de micro-organismes.....</b>	<b>175</b>
4.1.1. Fossilisation expérimentale d'Archées.....	175
4.1.1.1. Silicification de <i>P. abyssi</i> .....	175
4.1.1.2. Silicification de <i>M. jannaschii</i> .....	177
4.1.2.3. Modification du pH et choc osmotique suite à l'injection de la silice.....	178
4.1.2.3. Bilan de la fossilisation des Archées.....	179
4.1.2. Fossilisation expérimentale de Bactéries.....	180
4.1.2.1. Silicification de <i>Rhodovulum</i> sp.....	180
4.1.2.2. Silicification de <i>Geobacillus</i> sp. ....	182
4.1.2.3. Bilan de la fossilisation des Bactéries.....	184
4.1.3. Aspects généraux.....	185
4.1.3.1. Influence de la membrane sur comportement lors de la silicification (comparaison Gram-positives / Gram-négatives / Archées) .....	185
4.1.3.2. Fossilisation des EPS.....	187
4.1.3.3. Réponse microbienne à l'injection de la silice.....	188
4.1.4. Mécanismes de la silicification.....	192
4.1.4.1. Nature de la silice au cours de la fossilisation expérimentale.....	192
4.1.4.2. Précipitation de la silice en présence ou absence de micro-organismes.....	193
4.1.4.3. Mécanisme de fixation de la silice sur les EPS et les parois des micro-organismes.....	195
4.1.4.4. Chronologie de la silicification, en relation avec la mort des cellules.....	197
4.1.5. Variations du mode opératoire.....	199
4.1.5.1. Fossilisation dans une solution de silice pure.....	199
4.1.5.2. Influence de la concentration en silice.....	201

4.1.5.3. Bilan.....	204
<b>4.2. Adsorption et fixation d'ions métalliques par <i>M. jannaschii</i>.....</b>	<b>204</b>
4.2.1. Mécanismes de fixation et d'adsorption des cations métalliques .....	205
4.2.2. Comparaison des taux d'adsorption des différents types de Procaryotes.....	207
4.2.3. Influence de la fixation de fer sur la silicification.....	209
<b>4.3. Fossilisation expérimentale des tapis microbiens d'Octopus Spring (Yellowstone).....</b>	<b>210</b>
4.3.1. Fossilisation expérimentale d'un tapis microbien vivant.....	211
4.3.1.1. Fossilisation et préservation des filaments de <i>Chloroflexus</i> .....	211
4.3.1.2. Fossilisation et préservation des autres micro-organismes.....	212
4.3.1.3. Fossilisation et préservation des EPS.....	213
4.3.1.4. Réponse microbienne à la présence de silice.....	214
4.3.1.5. Survie des micro-organismes au cours de la fossilisation expérimentale.....	216
4.3.1.6. Evolution du pH au cours de la fossilisation.....	216
4.3.1.7. Précipitation de la silice, et mécanismes de fixation sur les cellules et EPS.....	217
4.3.1.8. Bilan.....	220
4.3.2. Fossilisation expérimentale d'un tapis microbien moribond.....	220
4.3.2.1. Etat des micro-organismes dans les prélèvements.....	220
4.3.2.2. Fossilisation naturelle et artificielle des différentes zones du tapis.....	221
4.3.2.3. Préservation des constituants du tapis.....	223
4.3.2.4. Bilan.....	223
4.3.3. Comparaison entre fossilisation naturelle et fossilisation artificielle.....	224
4.3.3.1. Comparaison avec la fossilisation <i>in situ</i> de <i>Chloroflexus</i> ( <i>Strokkur</i> , Islande ; Schultze-Lam et al., 1995) .....	224
4.3.3.2. Comparaison avec le siliceous sinter.....	225
4.3.4. Influence de la technique de préparation sur l'aspect du tapis microbien en microscopie électronique à balayage.....	226
<b>4.4. Devenir de la matière organique durant la fossilisation expérimentale de <i>M. jannaschii</i>.....</b>	<b>228</b>
4.4.1. Remarques préliminaires.....	228
4.4.2. Préservation finale de la matière organique.....	229
4.4.2.1. Comparaison des compositions initiales et finales.....	229
4.4.2.2. Etat final de la matière organique.....	230
4.4.3. Evolution de la matière organique tout au long de la fossilisation.....	231
4.4.3.1. Apport de matière organique pendant les premières 24 heures de fossilisation.....	231
4.4.3.2. Dégradation immédiate des EPS et stabilisation.....	236
4.4.3.3. Bilan des hypothèses.....	239
4.4.3.4. Origine de la matière organique présente dans le surnageant.....	240
4.4.4. Bilan de la préservation de la matière organique et rôle de la silice.....	240
<b>4.5. Implications pour l'exobiologie.....</b>	<b>242</b>
<b>Cinquième partie : Perspectives.....</b>	<b>246</b>
<b>Sixième partie : Conclusions.....</b>	<b>251</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>255</b>

## **Première partie : Introduction**

*Dear Sir Or Madam, will you read my book ?  
It took me years to write, will you take a look ?*

The Beatles – Paperback Writer

### **1.1. A la recherche des plus anciennes traces de vie**

#### **1.1.1. Généralités**

L'exobiologie est la science qui s'intéresse à l'origine de la vie. Elle regroupe l'étude de l'origine, de la distribution et de l'évolution de la vie dans le Système Solaire et dans l'Univers. Par anglicisme, cette discipline est également parfois appelée astrobiologie.

Etant consacrée à l'étude des origines de la vie sur Terre, et à la recherche directe de systèmes vivants ou de leurs traces sur les autres planètes et satellites du système solaire, l'exobiologie est un domaine de recherche particulièrement pluridisciplinaire. Elle s'appuie ainsi sur l'astrophysique, l'astronomie, la climatologie et les sciences de l'atmosphère, la géologie, géochimie et géophysique, la chimie, la biochimie, la microbiologie, et la paléontologie.

Jusqu'à présent, les seules formes de vie connues dans l'Univers sont terrestres. La découverte d'une vie extraterrestre, présente ou passée, nous permettrait d'améliorer considérablement notre définition du vivant. Ainsi, la découverte de vie (présente ou passée) sur Mars constituerait une avancée formidable. D'autre part, la découverte de vie sur une planète voisine nous permettrait de ne plus considérer l'apparition de la vie comme la conséquence d'un hasard extraordinaire, avec la concordance d'une multitude de conditions favorables, mais comme un phénomène potentiellement fréquent.

Pour comprendre les mécanismes qui ont permis à la vie d'apparaître sur notre planète, les recherches se basent sur trois démarches complémentaires :

- La première consiste à reproduire, en éprouvette ou sur ordinateur, les conditions qui régnaient sur la Terre primitive, dans le but de découvrir les réactions chimiques qui



ont conduit à l'émergence des molécules biologiques (acides nucléiques, protéines, par exemple) puis, dans un second temps, les cellules. C'est le domaine de la **chimie prébiotique**.

- La seconde approche, que l'on pourrait qualifier de réductionniste, consiste à rechercher parmi tous les organismes connus les formes les plus primitives, étant donné que ces dernières pourraient avoir conservé certaines des caractéristiques de la cellule ancestrale qui a engendré toutes les autres. C'est un domaine associant la **phylogénétique** et la **microbiologie** des extrêmophiles.
- La troisième approche, enfin, consiste en l'étude des plus vieilles traces de vie fossile, préservées dans les roches sédimentaires les plus anciennes de notre planète.

Cette étude s'inscrit dans les deux dernières démarches. Elle se base sur nos connaissances de la microbiologie des extrêmophiles pour la fossilisation expérimentale de micro-organismes analogues des formes de vie primitive, en simulant au mieux les conditions environnementales de la Terre primitive, avec l'objectif d'aider la recherche des plus anciennes traces de vie.

La micropaléontologie précambrienne est une science relativement récente. Jusqu'en 1950, on considérait que la vie était apparue relativement tardivement dans l'histoire de la Terre, vers 550 Ma (Schopf, 1999). Il était en effet jusque là impossible de détecter une quelconque trace de vie dans les roches les plus anciennes, datant du Précambrien. Toutefois, la complexité des plus vieilles formes de vie connues à l'époque laissait supposer une apparition bien plus ancienne de la vie sur Terre. La première avancée a eu lieu avec la découverte des premiers fossiles précambriens dans des roches siliceuses de 2 milliards d'années provenant de la formation Gunflint (Canada) (Tyler & Barghoorn, 1954).

### **1.1.2. Controverses concernant l'identification de microfossiles**

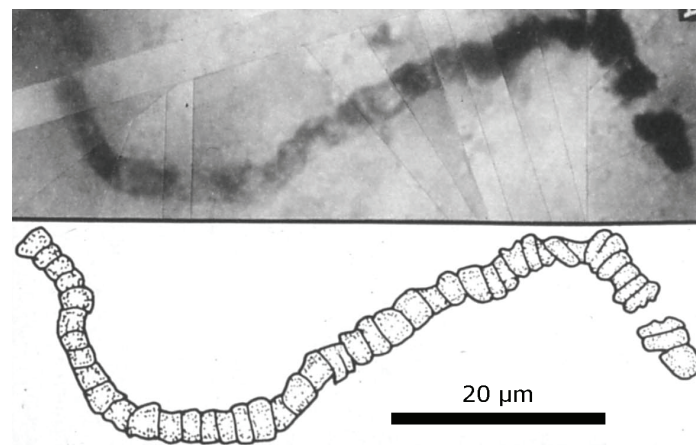
Les microfossiles datant de l'ère précambrienne sont particulièrement difficiles à étudier pour plusieurs raisons. Les affleurements de roches Archéennes sont rares, comparativement aux roches du Phanérozoïque, et ne se trouvent que dans des zones restreintes en Afrique du Sud, en Australie, et au Groenland. Les microfossiles sont par définition microscopiques, et les restes cellulaires sont souvent fortement dégradés par le

métamorphisme qui a eu amplement l'occasion d'agir durant plusieurs milliards d'années. Si les critères de reconnaissance permettent généralement d'identifier avec une bonne certitude des structures fossiles dans les roches du Protérozoïque, il n'en est pas de même pour celles de l'Archéen (Buick, 1990 ; Brasier *et al.*, 2002 ; Westall & Southam 2006), comme le démontre la controverse sur les microfossiles conservés dans les cherts d'Apex présentée ci-après.

### 1.1.2.1. La controverse sur les microfossiles d'Apex (3,465 Ga)

La difficulté de l'identification des traces de vie fossiles dans les plus vieilles roches sédimentaires terrestres est parfaitement illustrée par la controverse qui a suivie l'interprétation biogénique de structures carbonées présentes dans les cherts de la formation d'Apex (groupe Warrawoona, Pilbara, Australie).

En 1987, Schopf et Packer ont suggéré que ces cherts pouvaient renfermer des traces fossiles de micro-organismes photosynthétiques. Deux articles suivants (Schopf, 1992 ; Schopf, 1993) ont détaillé les observations, et ont permis de distinguer plusieurs espèces. De par leur morphologie filamenteuse (Fig. 1-1), les microfossiles d'Apex semblaient similaires aux cyanobactéries, et cette découverte permettait donc de conclure à l'existence de la photosynthèse oxygénique il y a 3,465 Ga.



**Fig. 1-1 : Exemple de filament présent dans les cherts d'Apex vu en microscopie optique, et schéma interprétatif, tirés de Schopf (1993).**

Mais quelques années plus tard, Brasier *et al.* (2002) ont repris les lames minces de la formation d'Apex utilisées par Schopf, et constaté que certains filaments montraient des formes inhabituelles pour des cyanobactéries, avec par endroits des épaississements ou des

ramifications. Ceci a amené ces auteurs à émettre de sérieux doutes sur l'interprétation qui en avait été faite à l'origine.

Une partie de la différence d'appréciation entre Schopf et Brasier vient de l'interprétation, toujours difficile, de structures tridimensionnelles en microscopie optique.

Un autre aspect de cette controverse est lié au contexte géologique et environnemental des roches où ont été trouvées les structures suspectes. Une reconnaissance in situ des cherts de la formation Apex effectuée par l'équipe de Brasier (Brasier *et al.*, 2002) a montré que ces cherts ne s'étaient pas déposés au fond d'une mer peu profonde, mais étaient très probablement issus d'une veine hydrothermale. Or, ces veines hydrothermales, où circule une eau à une température bien supérieure à 100°C, ne sont pas des habitats plausibles pour des micro-organismes photosynthétiques aérobies. Ainsi l'identification de microfossiles au sein d'une roche ne peut avoir de sens que si cette dernière s'est initialement formée dans des conditions compatibles avec l'existence de formes de vie. Enfin, la signature isotopique du carbone des structures observées, qui tombait dans l'intervalle attribué au fractionnement isotopique lié à l'activité photosynthétique, peut également s'expliquer selon Brasier *et al.* (2002) par une réaction de type Fischer-Tropsch, totalement abiotique.

Au final, pour Brasier *et al.* (2002), l'interprétation micropaléontologique des structures emprisonnées dans les cherts d'Apex était basée sur des analyses erronées du contexte géologique, ainsi que sur une étude subjective des critères morphologiques. Les microfossiles d'Apex ne seraient rien d'autre que des artefacts organiques produits par des sources hydrothermales.

### **1.1.2.2. La controverse sur les traces de vie fossiles dans la météorite martienne ALH 84001**

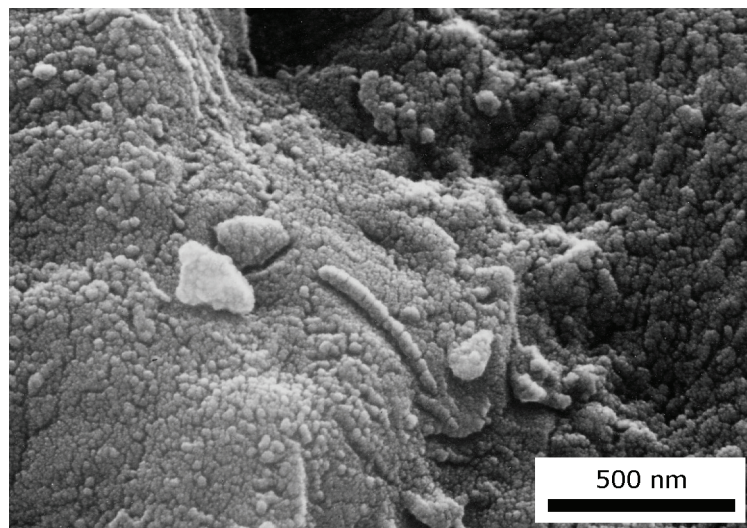
Les difficultés liées à l'étude des microfossiles anciens ont également été soulignées par une autre controverse, cette fois concernant des traces de vie présumées dans la météorite martienne ALH 84001, où plusieurs traces de vie supposées ont été identifiées (McKay *et al.*, 1996).

Tombée dans l'Antarctique il y a 13 000 ans mais découverte seulement en 1984 (Score, 1997), cette météorite s'est formée à la surface de Mars il y a 4,5 Ga, à une époque où

## Introduction

cette planète avait une activité géologique très importante. Le matériau d'origine de cette météorite est un type de basalte formé en profondeur dans une chambre volcanique. Après avoir été amenée à proximité de la surface par un violent impact météoritique, cette roche a été mise en contact avec des fluides de surface qui ont pu s'y infiltrer par des fissures et, au passage, y déposer des minéraux. Un dernier impact, il y a 16 Ma a éjecté la météorite dans l'espace. Elle a finalement terminé sa course sur Terre.

Les fractures dans la météorite sont parsemées de globules de carbonates orangés, d'une taille variant de 100 à 250  $\mu\text{m}$  (McKay *et al.*, 1996) et datant certainement de 3,9 Ga (Borg *et al.*, 1999) et qui recèleraient des traces de vie (McKay *et al.*, 1996). Les plus marquantes sont certainement les structures dont la morphologie rappelle celle de bactéries (Fig. 1-2), à l'exception de leur taille, extrêmement petite (20 à 100 nm).



**Fig. 1-2 : Structure en bâtonnet présente dans la météorite ALH 84001, vue en microscopie électronique (McKay *et al.*, 1996).**

Cette petite taille amène les premiers doutes. En effet, les microbiologistes estiment qu'en dessous de 200 nm, un organisme ne saurait être viable (Szostak, 1999). Les nanofossiles d'ALH 84001 seraient donc trop petits. Avec une taille de 500×20 nm, ils ressemblent davantage à des constituants cellulaires qu'à des cellules entières.

Toutefois, ces nanostructures ne constituaient qu'un indice parmi d'autres de l'existence de formes de vie passées au sein de la météorite. Au sein des carbonates, des cristaux de magnétite et de sulfures biogéniques, ainsi que des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont également été mis en évidence. Pris séparément, chaque indice n'est pas en lui même une preuve incontestable d'une présence de vie. Cependant, McKay *et al.*

(1996) ont conclu que, pris ensemble, ils rendaient l'hypothèse biologique tout à fait envisageable.

Néanmoins, depuis la publication des résultats de McKay *et al.* (1996), la plupart des indices en faveur de la présence de la vie ont trouvé une explication abiotique. Ainsi, les « nanofossiles » pourraient n'être que des excroissances cristallines. Il est également possible qu'il s'agisse d'une contamination par des bactéries terrestres : Toporski *et al.* (1999) ont ainsi mis en évidence des bactéries terrestres dans la météorite martienne Nahkla. Les HAP sont, de leur côté, des composés organiques simples qui peuvent soit être d'origine inorganique, soit être des résidus d'une dégradation très avancée de biomolécules. De plus, il a été montré que 80 % des HAP présents dans ALH 84001 provenaient d'une contamination terrestre (Bada *et al.*, 1998). Seuls les cristaux de magnétite semblent encore résister : ils présentent une forte similitude avec les cristaux qui se forment à l'intérieur des bactéries magnétotactiques. Mais des mécanismes abiotiques ont également été proposés pour leur formation (Treiman *et al.*, 2003 ; Taylor & Barry, 2004).

Ainsi même si les possibilités que cette météorite recèle des traces d'une vie martienne se sont amenuisées, ALH 84001 a tout de même entraîné un gain d'intérêt sans précédent pour toutes les problématiques de l'exobiologie.

Au final, ces débats au sujet des cherts d'Apex et de la météorite ALH 84001 ont permis d'illustrer les différents problèmes qui peuvent accompagner et perturber la recherche des traces de vie passée, et de montrer l'insuffisance de nos connaissances concernant les biosignatures, les risques importants d'une contamination des roches anciennes, et la nécessité d'utiliser les techniques d'observation et d'analyse adéquates.

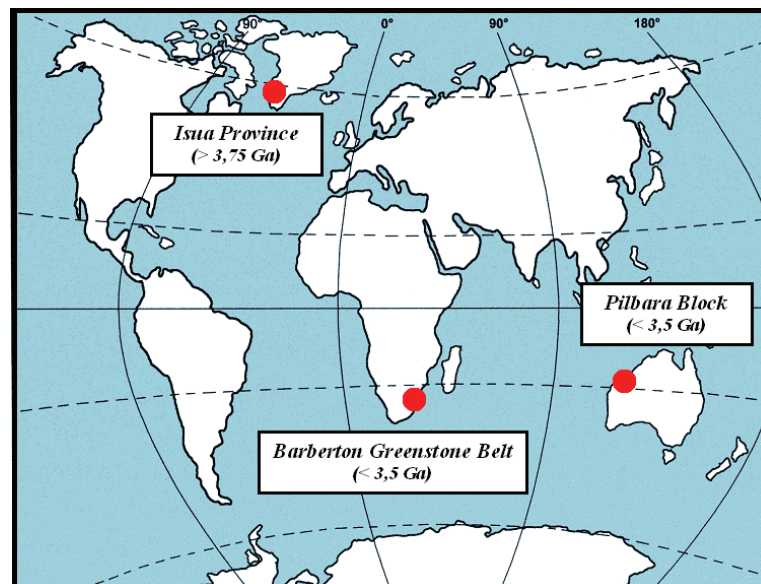
### **1.1.3. Les micro-organismes fossiles**

#### **1.1.3.1. Inventaire des formations fossilifères et des fossiles découverts**

La recherche des traces de vie primitive dans les plus anciennes roches terrestres est malheureusement limitée par le fait que la tectonique des plaques les a pratiquement toutes

éliminées, ne laissant que quelques vestiges, souvent fortement métamorphisés, et où les rares biosignatures potentielles présentes ont vu leur structure et leur chimie altérées.

Les terrains contenant les plus anciennes roches sédimentaires préservées se trouvent dans les *Greenstone Belts* d'Isua et d'Akilia (Groenland, 3,8 Ga), de Barberton (Est de l'Afrique du Sud, 3,5-3,3 Ga) et du Pilbara (Nord-ouest de l'Australie, 3,5-3,3 Ga) (Fig. 1-3). Les recherches de traces de vie dans ces roches se basent historiquement sur des études commencées dans les années 1950 qui ont conduit à la découverte de microfossiles coccoïdes et filamenteux dans les stromatolites de la formation du Gunflint (Canada, 1,9 Ga) (Barghoorn & Tyler, 1965).



**Fig. 1-3 : Localisation des affleurements rocheux contenant des roches sédimentaires de l'Archéen inférieur.**

On trouve au sud-ouest du Groenland les plus vieilles roches sédimentaires connues (3,8 Ga), au niveau des *Greenstone Belts* d'Isua et d'Akilia. Dans ces roches très métamorphisées, on a trouvé les plus anciennes traces de vie, sur la base de signatures isotopiques du carbone. Les rapports des isotopes du carbone suggéraient en effet la présence de micro-organismes méthanogènes et photosynthétiques (Schidlowski, 1988 ; Mojzsis *et al.*, 1996 ; Rosing, 1999). Ces traces de vie ont cependant été vivement contestées avec (i) la mise en évidence d'une contamination bien plus récente, (ii) une explication abiotique des structures observées, et (iii) la mise en doute des rapports isotopiques du carbone comme biomarqueurs (van Zuilen *et al.*, 2002 ; Westall & Folk, 2003).

Contrairement aux roches Groenlandaises, les *Greenstone Belts* d'Australie et d'Afrique du Sud ont été généralement très peu métamorphisées. C'est donc dans les roches de ces formations qu'ont été faites les découvertes les plus significatives pour la recherche des plus anciennes traces de vie. Les traces de vie potentielles contenues dans les roches du Pilbara, et plus particulièrement dans la formation des cherts d'Apex ont déjà été évoquées, ainsi que les controverses qui ont suivi (cf. paragraphe 1.1.2.1.).

Ce qui suit concerne quelques exemples des découvertes de traces de vie effectuées ces 25 dernières années. Le bilan n'est pas exhaustif (pour un inventaire récent, voir Westall & Southam, 2006), mais il permet de constater les différents types de traces de vie que l'on retrouve dans les roches de l'Archéen inférieur, les différents types d'habitats de l'époque, et les différents types de micro-organismes qui étaient alors présents.

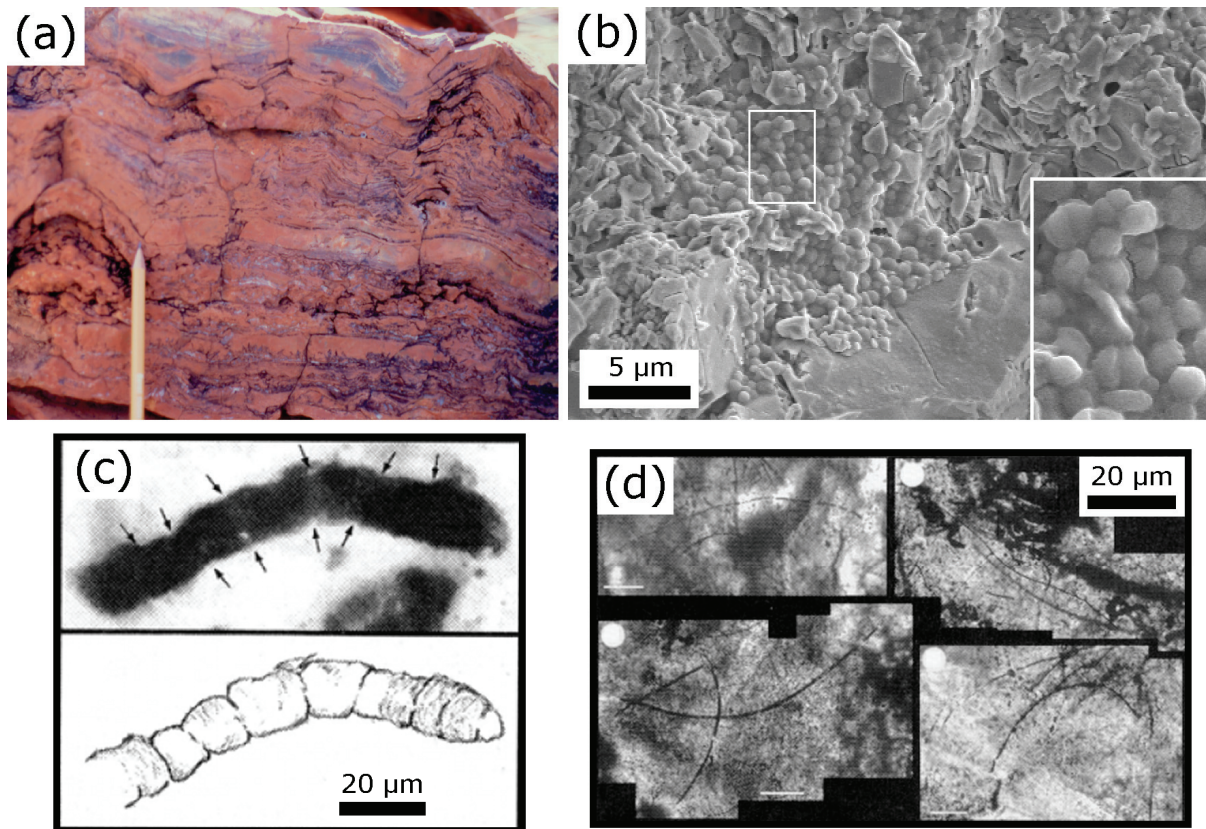
Des traces de vie (colonies de micro-organismes silicifiés, ou restes de molécules organiques) ont ainsi été identifiées dans des dépôts ou des sédiments subsurfaciques. Ainsi des colonies de coques fossilisées (0,5-0,8  $\mu\text{m}$ ) avec leurs EPS ont été mises en évidence par microscopie électronique à la périphérie et à l'intérieur de particules volcaniques dans les cherts de Kitty's Gap (Pilbara, Australie) datant de 3,446 Ga (Westall *et al.*, 2006a ; Fig. 1-4b). D'après le contexte environnemental du dépôt de ces particules, il a été suggéré qu'il pouvait s'agir de micro-organismes lithotrophes. Des kéroènes et de possibles restes de filaments ont également été identifiés au Pilbara (North Pole) dans des restes de veines hydrothermales vieilles de 3,46 Ga (Ueno *et al.*, 2004 ; Fig. 1-4c).

De nombreuses traces de vie ont été trouvées dans des roches formées à l'interface lithosphère/hydrosphère. Au Pilbara (North Pole), des filaments pyritisés ont ainsi été identifiés dans des dépôts de sulfures volcaniques (*volcanogenic massive sulphide deposits*, ou VMS) vieux de 3,235 Ga, liés à des fumeurs noirs présents à des profondeurs inférieures à 100 mètres (Rasmussen, 2000 ; Fig. 1-4d). On suppose que ces filaments pouvaient être ceux de chimiotrophes thermophiles utilisant du soufre.

Formées à moindre profondeur, des formations ressemblant à des stromatolites (Fig. 1-4a) ont été retrouvées au Pilbara et à Barberton et ont fait l'objet de nombreuses études (Walter *et al.*, 1980 ; Lowe, 1980 ; Walter, 1983 ; Nijman *et al.*, 1998 ; Westall *et al.*, 2002 ; Westall, 2003, 2004 ; van Kranendonk *et al.*, 2003 ; Allwood *et al.*, 2006). Dans un premier temps, la similitude avec des structures plus jeunes de l'Archéen ou du Protérozoïque a laissé penser qu'il pouvait s'agir de bactéries photosynthétiques oxygéniques. Il y a eu également



des débats quant à la biogénicité de ces structures (Lowe, 1994). Au final, l'étude des laminations de ces structures, qui montrent des déformations plastiques, a permis de trancher et de montrer qu'elles avaient été formées par des films organiques (Westall *et al.*, 2002 ; van Kranendonk *et al.*, 2003 ; Allwood *et al.*, 2006). Les observations en microscopie électronique à balayage des cherts de Josefsdal (Barberton) (Westall *et al.*, 2001, 2004 ; 2006b ; Westall, 2003, 2004) ont mis en évidence des tapis microbiens fossilisés, avec des signes d'un écoulement d'eau dans un environnement évaporitique, ainsi que des micro-organismes en bâtonnets. Ces tapis ont été probablement formés par des photosynthétiques anoxygéniques. Des tapis similaires ont été retrouvés dans les cherts du Kitty's Gap (Pilbara ; Westall *et al.*, 2006a), formés là aussi probablement par des micro-organismes photosynthétiques anoxygéniques.



**Fig. 1-4 :** (a) Stromatolites coniques datant de l'Archéen inférieur (> 3,46 Ga, North Pole Dome, Pilbara, Australie). Photographie : D. Marchesini. (b) Colonie silicifiée de micro-organismes vue en microscopie électronique à balayage (MEB) dans le chert de Kitty's Gap (3,466 Ga, Pilbara, Australie ; Westall *et al.*, 2006a). (c) Structures carbonées bactériomorphes observées en microscopie optique dans les cherts du North Pole Dome (3,46 Ga, Pilbara, Australie ; Ueno *et al.*, 2004). (d) Possibles microfossiles filamenteux pyritisés vus en microscopie optique dans un dépôt de sulfures du North Pole Dome (3,230 Ga, Pilbara, Australie ; Rasmussen, 2000).



### **1.1.3.2. Traces de vie et méthodes de détection**

La préservation structurale et biogéochimique des microorganismes est influencée par l'efficacité du processus de fossilisation. Celui-ci est d'une importance particulière puisqu'au final il déterminera l'apparence des micro-organismes préservés (s'ils sont effectivement préservés), et la présence des détails qui seront nécessaires à leur identification.

La plupart des critères d'identification des micro-organismes peuvent en effet être perdus lors de la fossilisation, suivant l'état des cellules (vivantes, moribondes, lysées) au début du processus, et suivant l'efficacité de la fossilisation. Celle-ci peut ainsi détruire sélectivement plusieurs éléments structurels ou biogéochimiques.

Ainsi au final, les micro-organismes fossiles ne sont reconnaissables que par une palette de signatures morphologiques, moléculaires ou isotopiques. Comme l'ont montré les controverses des cherts d'Apex (Schopf, 1993 ; Brasier *et al.*, 2002), ces signatures, considérées individuellement, ne constituent pas un critère absolu de biogénicité, puisqu'elles peuvent très bien être dues à un artefact ou être expliquées par un processus abiotique. C'est seulement la concordance d'un certain nombre de ces signatures qui permettra d'affirmer avec certitude l'origine biologique des structures observées.

Signatures morphologiques : les micro-organismes ont généralement des formes simples, sphériques, filamenteuses, ou en bâtonnets. Mais ce critère est limité : des grains minéraux ou des bulles peuvent également avoir une forme sphérique, et le cas des microfossiles d'Apex (Schopf, 1993) a montré que des structures organiques mais abiogéniques peuvent avoir un aspect filamenteux (Garcia-Ruiz *et al.*, 2003). De manière générale, il faut que la morphologie soit semblable aux formes de vie connues, et que les structures observées ne soient pas en dessous de la taille limite des cellules microbiennes (critère éliminatoire pour les bâtonnets nanométriques de la météorite ALH 84001). Selon leur taille, ils peuvent être repérés en microscopie optique (taille de l'ordre de la dizaine de microns), ou en microscopie électronique (taille micrométrique).

Des traces d'une communauté microbienne doivent également être apparentes, comme une association des microfossiles en colonies (la présence d'un grand nombre de structures similaires est un bon point), la division en segments dans le cas de filaments, la présence de biofilms et de substances extracellulaires (ou EPS, pour *Extracellular Polymeric Substances*). Le biofilm formé par les micro-organismes peut grandement aider leur repérage et leur

identification de par son étendue, sa morphologie qui contraste avec les grains minéraux, et son bon potentiel de préservation qui a été mis en évidence à plusieurs reprises dans les roches de l'Archéen (Walsh, 1992, 2004 ; Westall *et al.*, 2000, 2001, 2006b ; Tice & Lowe, 2004 ; Allwood *et al.*, 2006).

La paroi est souvent la seule structure qui reste dans les microfossiles. Des traces de la structure de cette paroi, d'une rupture consécutive à une lyse, de plissements signes d'une rétraction sous l'effet de phénomènes osmotiques sont autant d'indices de biogénicité.

Signatures moléculaires : Bien souvent, les signatures morphologiques seules ne suffisent pas pour affirmer la biogénicité d'une structure présente dans une roche. La matière organique qui a été préservée peut alors fournir des indices supplémentaires.

Certaines molécules organiques ont ainsi une grande résistance à la diagenèse et au métamorphisme, et peuvent de surcroît donner des informations sur le type de micro-organisme d'origine. Ainsi les hopanes caractérisent des Bactéries, comme par exemple les cyanobactéries, les stéranes signalent des Eucaryotes, et les chaînes d'isoprénoïdes permettent d'identifier des restes d'Archées (Brocks *et al.*, 1999 ; Summons *et al.*, 1999).

Toutefois ces signatures moléculaires sont également à considérer avec précaution, puisqu'elles peuvent venir d'une contamination (amenée lors de processus géologiques plus récents, voire même lors de la préparation des échantillons en laboratoire). De plus, les quantités de matière organique préservée sont souvent infimes, et donc difficiles à caractériser, et nécessitent l'utilisation de techniques analytiques de plus en plus poussées.

Signatures isotopiques : Ces précédents types de signatures sont toutefois inutilisables si la roche contenant les microfossiles a subi un trop fort métamorphisme. A partir d'une certaine température (350-500°C) et une certaine pression (3 kbars), les corps cellulaires sont détruits, et la matière organique également, compliquant ainsi l'identification sur des critères morphologiques ou moléculaires. En revanche les rapports isotopiques sont conservés.

On peut utiliser les rapports isotopiques du carbone ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ) sur ce que l'on soupçonne être de la matière organique. Un enrichissement en carbone a longtemps été considéré comme la trace d'une activité biologique. C'est sur cette base que Mojzsis *et al.* (1996) avaient supposé la présence des plus anciennes traces de vie dans les roches d'Isua et d'Akilia (~3,8 Ga, Groenland). Cependant, des processus de synthèse organique par des réactions de type Fischer-Tropsch peuvent fournir des composés carbonés avec une composition isotopique similaire à celles produites par la vie. Cette hypothèse a été suggérée

par van Zuilen *et al.* (2002) pour contredire la première interprétation de Mojzsis *et al.* (1996).

*Signatures biominérales* : Enfin, on peut trouver trace d'une présence de vie passée par les traces d'interactions entre les micro-organismes et la roche, comme des traces de corrosion, ou la formation de minéraux particuliers.

La multiplication des signatures de vie identifiées, qui facilitent l'identification des microfossiles, a été rendue possible par le développement de techniques d'observation et d'analyse de plus en plus précises. Jusqu'à récemment, les découvertes de microfossiles ont été faites par microscopie optique (par exemple Barghoorn & Tyler, 1965 ; Schopf, 1993), avec bien entendu des limitations en matière de résolution. Ces dernières années, de nouvelles découvertes ont été rendues possibles par l'utilisation de techniques pointues, comme la microscopie électronique en transmission après découpe FIB (*Focused Ion Beam*, Kempe *et al.*, 2005), la microanalyse isotopique par sonde ionique (House *et al.*, 2000), la cartographie submicrométrique du carbone par microsonde électronique (Boyce *et al.*, 2005), l'analyse organique in-situ par micropyrolyse laser (Arouri *et al.*, 1999, 2000), la microspectroscopie Raman (Schopf, 2002), le C-XANES (*Carbon X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy* ; Cody *et al.*, 1996), le S-XANES (*Sulfur X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy* ; Lemelle *et al.*, 2008), le FTIR (*Fourier Transformed InfraRed spectroscopy* ; Marshall *et al.*, 2005), le NanoSIMS (*Nano-Secondary Ion Mass Spectrometry* ; Oehler *et al.*, 2007), et la microscopie à force atomique (AFM, Lemelle *et al.*, 2008).

### **1.1.3.3. Mode de préservation des micro-organismes primitifs**

Les océans de l'Archéen inférieur étaient saturés en silice (Carson, 1991), à la différence de ceux du Phanérozoïque où le développement d'organismes à tests siliceux, comme les diatomées, a amené la silice à sous-saturation.

Le mode prédominant de préservation des micro-organismes de l'Archéen inférieur semble avoir été la silicification (Westall *et al.*, 2001, 2006a, 2006b), bien que la calcification et la silicification se soient produites toutes les deux sur des structures probablement issues de tapis microbiens photosynthétiques (Westall & Southam 2006).

## 1.2. La fossilisation expérimentale comme aide à la compréhension de la fossilisation naturelle

### 1.2.1. La fossilisation expérimentale

#### **1.2.1.1. Les précédentes fossilisations expérimentales**

Depuis que les premiers micro-organismes ont été identifiés dans des cherts (Barghoorn & Tyler, 1965), plusieurs silicifications expérimentales de micro-organismes ont été entreprises pour mieux comprendre les mécanismes de ce processus (Oehler & Schopf, 1971 ; Oehler, 1976 ; Francis *et al.*, 1978 ; Birnbaum *et al.*, 1989 ; Westall *et al.*, 1995 ; Westall, 1997 ; Phoenix *et al.*, 2000 ; Toporski *et al.*, 2002 ; Yee *et al.*, 2003 ; Benning *et al.*, 2004a, 2004b ; Lalonde *et al.*, 2005). Ces études ont montré que différents types de micro-organismes pouvaient être fossilisés, avec une bonne préservation des structures cellulaires.

Les toutes premières expérimentations (Oehler & Schopf, 1971 ; Oehler, 1976 ; Francis *et al.*, 1978) se sont concentrées sur la silicification des cyanobactéries, qui étaient à l'époque les microfossiles les plus communément retrouvés dans les roches anciennes, et qui étaient alors considérées comme des analogues des formes de vie primitives. Dans les expérimentations qui ont suivi, d'autres types de micro-organismes ont été fossilisés expérimentalement, incluant la Bactérie Gram-positive *Bacillus subtilis* (Ferris *et al.*, 1988), un spirochète (Francis *et al.*, 1978), la Bactérie *Desulfovibrio desulfuricans* (Birnbaum *et al.*, 1989), un florilège de micro-organismes marins (Westall *et al.*, 1995), les Bactéries Gram-négatives *Pseudomonas vesicularis*, *P. acidovorans*, *P. fluorescens* et la Gram-positive *Bacillus laterosporus* (Westall, 1997), les Bactéries *Desulfovibrio indonensis* et *P. fluorescens* (Toporski *et al.*, 2002), la cyanobactérie *Calothrix sp.* (Phoenix *et al.*, 2000 ; Benning *et al.*, 2004a, 2004b), et la Bactérie thermophile et chimolithotrophe *Sulfurihydrogenibium azorense* (Lalonde *et al.*, 2005).

En parallèle de nombreuses études ont porté sur la silicification *in situ* des micro-organismes dans les sources chaudes, et leur rôle dans la formation des dépôts siliceux (*siliceous sinters*), qui pourraient être des analogues modernes des formations siliceuses fossilifères de la Terre primitive (Konhauser *et al.*, 2001). Ces études ont ainsi concernés de

multiples systèmes hydrothermaux, comme ceux de Yellowstone (Walter *et al.*, 1972 ; Cady & Farmer, 1996), d'Islande (Schultze-Lam *et al.*, 1995 ; Konhauser & Ferris, 1996 ; Konhauser *et al.*, 2001) ou de Nouvelle-Zélande (Jones *et al.*, 1998, 2001, 2003, 2004 ; Handley *et al.*, 2005).

### **1.2.1.2. Ce qu'elles nous ont appris**

Il ressort de ces études que la silicification des micro-organismes est un processus dans lesquels ces derniers et leurs EPS n'ont qu'un rôle passif et ne sont que des supports disponibles pour la fixation de la silice. Les micro-organismes n'augmentent pas notablement la cinétique et le taux de la précipitation de la silice. Ainsi, quand la concentration de silice dans l'environnement est très élevée, la polymérisation de cette silice et sa précipitation sont spontanées et ne nécessitent pas de catalyse microbienne. La silicification serait donc ainsi la conséquence inévitable de l'exposition de micro-organismes à un fluide riche en silice. Au final, il y aurait peu de silice fixée par la biomasse dans les milieux sous-saturés en silice ; et dans les milieux saturés, la fixation de la silice se produirait de manière identique à ce qui se passe par la voie inorganique.

Ces études ont montré la rapidité de la silicification, qui est un phénomène qui se déclenche très rapidement. Cette rapidité est un facteur crucial de l'efficacité de la silicification. Une silicification rapide évite la décomposition des cellules vivantes ou tout juste lysées, susceptible d'intervenir en quelques jours. Elle évite également que d'autres micro-organismes hétérotrophes ne se nourrissent des restes microbiens.

Les différentes fossilisations expérimentales ont permis de montrer qu'une grande variété de micro-organismes pouvait être fossilisée, mais qu'il existait des différences dans les degrés de silicification de chaque espèce. La charge de la surface cellulaire ainsi que la disponibilité des groupes fonctionnels jouent un rôle fondamental dans le processus initial de la silicification (Leo & Barghoorn, 1976 ; Beveridge & Fyfe, 1985 ; Ferris & Beveridge, 1986 ; Westall, 1997).

En effet, ces études ont permis de montrer que la phase initiale d'immobilisation de la silice par les bactéries peut se faire de différentes manières, qui dépendent de la charge de la

structure organique (Kohnauser *et al.*, 2004). Dans le cas d'une paroi neutre (cf. la gaine des cyanobactéries), des liaisons hydrogènes se forment entre les groupes hydroxyles de la silice ( $\text{Si(OH)}_4$ ) et les groupes hydroxyles de la paroi cellulaire (Heaney & Yates, 1998). Si la paroi est chargée négativement, un pont de cations métalliques (par exemple les ions  $\text{Fe}^{3+}$  ; Fein *et al.*, 2002) peut servir d'intermédiaire entre la paroi et la silice. Ferris *et al.* (1988) avaient par ailleurs constaté que la présence de fer fixé sur la paroi des micro-organismes pouvait ralentir la dégradation des cellules, et laissait ainsi davantage de temps pour que la fossilisation procède efficacement. Enfin, l'association entre la silice et des groupes fonctionnels chargés positivement (groupe amine par exemple) reste à préciser. Une fois que l'ensemble des groupes fonctionnels disponibles est occupé par la silice, le précipité de silice peut continuer de croître par polymérisation de façon abiotique. Par la suite, la silice remplace graduellement la structure organique et, en même temps, piège les molécules organiques en cours de dégradation dans la matrice minérale qui se polymérise.

Westall (1997) a montré que le plus grand nombre de groupes fonctionnels (carboxyles, hydroxyles et phosphoryles) disponibles dans la paroi des Bactéries Gram-positives, par rapport aux Gram-négatives, conduit à une fossilisation plus rapide et plus importante chez les premières que chez les secondes. Un certain nombre d'études ont également montré la grande capacité des EPS à être fossilisés, par comparaison avec les cellules elles-mêmes, en raison d'un plus grand nombre de groupes fonctionnels disponibles permettant de fixer les ions minéraux en solution (Westall *et al.*, 2000 ; Toporski *et al.*, 2002 ; Lalonde *et al.*, 2005). Dans certains cas, les micro-organismes sont capables d'éviter un piégeage dans une matrice minérale par une abondante production d'EPS (Lalonde *et al.*, 2005). Les EPS ont dans ce cas un rôle protecteur similaire à celui des gaines des cyanobactéries (Phoenix *et al.*, 2000 ; Benning *et al.*, 2004b).

Enfin, différentes études ont montré que certains micro-organismes semblaient résister à la silicification, et pouvaient par la même survivre pendant plusieurs mois dans un milieu saturé en silice (Westall *et al.*, 1995 ; Phoenix *et al.*, 2000). Les cellules mortes ont également davantage de groupes fonctionnels disponibles que les cellules vivantes (Westall *et al.*, 2000 ; Toporski *et al.*, 2002, Lalonde *et al.*, 2005) en raison des différents moyens que les cellules vivantes peuvent mettre en œuvre pour éviter la précipitation de silice sur leurs structures.

Une simulation de la fossilisation en laboratoire ne peut certes pas recréer plusieurs milliards d'années de diagenèse et de métamorphisme. Toutefois, elle permet d'étudier les

premiers instants de la fossilisation, qui sont absolument déterminants pour la préservation des micro-organismes et la réussite de la fossilisation. Elle permet dans ce cas de voir quels sont les signaux morphologiques et moléculaires qui passent l'épreuve de ces premiers mois de fossilisation, et lesquels sont perdus.

### **1.2.2. Les moyens d'améliorer notre connaissance de la fossilisation**

Malgré ces travaux sur la fossilisation expérimentale, on manque encore de données concernant les types de micro-organismes qui peuvent être fossilisés, les changements morphologiques induits par la minéralisation, et surtout leur potentiel de préservation. Ces questions sont d'une grande importance pour la connaissance la faune microbienne de l'Archéen inférieur, car les seuls microfossiles de cette époque dont nous disposons sont des coques, des filaments ou des bâtonnets qui ont formé des tapis microbiens dans des eaux riches en éléments minéraux dissous (bilan dans Westall & Southam 2006). Cela signifie que de nombreuses espèces, ou communautés microbiennes qui se sont développées dans des eaux peu minéralisées n'ont eu que peu de chances d'être préservées.

La non-fossilisation de ces micro-organismes pourrait s'expliquer par différents comportements face à la préservation, par les mécanismes de préservation, et par les processus d'altération qui suivent la fossilisation (Reysenbach & Cady, 2001). De plus, ce que l'on retrouve le plus souvent dans les microfossiles préservés dans les cherts sont les restes des gaines et des parois des cellules (Knoll, 1985). Toutes les structures du cytoplasme ont depuis longtemps disparu, ce qui rend difficile et sujette à controverse une comparaison avec des espèces actuelles.

Schultze-Lam *et al.* (1995) ont ainsi montré qu'au cours de la silicification, les filaments de *Chloroflexus* (Bactérie verte non-sulfureuse) perdaient les détails de leur cytoplasme et de leur paroi, ce qui pouvait facilement entraîner une confusion avec des cyanobactéries.

Les silicifications expérimentales précédemment évoquées ont montré que différents types de micro-organismes peuvent être fossilisés, avec des degrés différents de fossilisation, selon des schémas définis. Mais au final, seul un nombre limité de micro-organismes a été fossilisé, et ce, selon plusieurs modes opératoires différents.

Konhauser *et al.* (2003) ont proposé la feuille de route suivante pour améliorer nos connaissances sur la fossilisation, avec deux approches complémentaires :

1) Procéder à une étude systématique par la fossilisation expérimentale d'un grand nombre de souches microbiennes, dans des conditions expérimentales similaires. Toutefois cette approche *in vitro* ne place pas les micro-organismes dans un contexte environnemental, et ne prend donc pas en compte les interactions qui peuvent se produire au sein d'une communauté microbienne avec différentes espèces. Une telle approche ne reproduit pas non plus les changements qui se produisent dans les environnements naturels.

2) Une seconde approche est l'étude de la silicification de communautés microbiennes qui forment des tapis dans les sources chaudes, qui constituent de bons analogues des conditions de la Terre primitive (température élevée, saturation des eaux en silice). Ces tapis possèdent une très grande diversité microbienne (présence de Bactéries thermophiles, parfois photosynthétiques anoxygéniques, d'Archées hyperthermophiles, de cyanobactéries).

### **1.2.3. Conclusions, problématique générale et objectifs**

D'une part, les controverses concernant les cherts d'Apex et la météorite ALH 84001 ont souligné notre manque de connaissance des processus de fossilisation et nos difficultés pour identifier avec certitude des microfossiles dans des roches anciennes, qu'elles soient terrestres ou martiennes.

D'autre part, la fossilisation expérimentale, qui permet d'améliorer ces connaissances, n'a pas (ou peu) encore été appliquée aux types de micro-organismes que l'on suppose avoir été présents sur Terre à l'Archéen inférieur, et qui pourraient également constituer une forme de vie martienne.

La démarche de cette thèse est donc de réaliser la fossilisation expérimentale de micro-organismes extrémophiles qui auraient pu vivre et se développer dans les conditions de la Terre primitive à l'Archéen.

Ainsi, les objectifs de cette étude sont de compléter les données existantes sur la fossilisation expérimentale des micro-organismes, de mieux comprendre par la même occasion les mécanismes mis en jeu lors de la silicification, et de suivre le devenir de la matière organique sous toutes ses formes (cellules, EPS) à travers ses différents constituants



(lipides, acides aminés, sucres). Les objectifs visés sont donc de préciser les signatures morphologiques et moléculaires qui pourraient aider à terme à l'identification des micro-organismes fossiles dans les roches anciennes, terrestres ou extra-terrestres (par exemple martiennes).

### **1.3. Micro-organismes analogues des formes de vie primitives, et sélection des espèces à étudier**

#### **1.3.1. Ce que l'on sait des premières formes de vie**

On pense communément que la vie sur Terre a évolué à partir de cellules primitives qui auraient seulement pu apparaître après la fin du « *Late Heavy Bombardment* » (Lowe & Byerly, 1986 ; Lowe *et al.*, 2003), c'est à dire après 3,85 Ga.

Toutefois, l'amélioration des connaissances sur les micro-organismes extrêmophiles a montré qu'il était pratiquement impossible d'éradiquer totalement les Procaryotes (Archées ou Bactéries). Ainsi, il est donc possible que la vie soit apparue sur Terre avant 4,0 Ga et ait survécu au bombardement météoritique intense, dans un habitat protégé (par exemple sous la surface).

Cette hypothèse est renforcée par les analyses phylogénétiques qui montrent que les hyperthermophiles sont regroupées à la base de l'arbre (Pace, 1997). On ne considère pas les hyperthermophiles comme les plus vieilles formes de vie, mais elles pourraient représenter les formes de vie ayant survécu à un cataclysme, comme un impact météoritique, grâce à leur hyperthermophilie (théorie du « *Hot Bottleneck* », intraduisible en français).

L'étude des microfossiles de l'Archéen inférieur et des roches les contenant a permis de suggérer qu'une grande variété de métabolismes était présente à l'époque, avec les micro-organismes chimiotrophes, photosynthétiques anoxygéniques, ou méthanogènes (Westall & Southam, 2006). Ainsi, de par leur aspect, leurs colonies, la présence de tapis microbiens, leur diversité de morphologie et de métabolisme, et leur grande distribution environnementale, les colonies microbiennes de cette époque étaient étonnamment similaires à celles que l'on trouve actuellement.

### **1.3.2. Micro-organismes analogues des formes de vie primitives**

Lorsque l'on fait le bilan des précédentes fossilisations expérimentales (cf. paragraphe 1.2.1.1.), il est surprenant de constater que la dernière étude entreprise (Lalonde *et al.*, 2005) est également la première à s'intéresser à une Bactérie thermophile. De plus, si nombre de Bactéries ont été utilisées jusqu'à présent pour ces études, aucune n'a porté sur la fossilisation expérimentale d'Archées, qui constituent pourtant l'un des trois domaines du vivant.

Ce manque de données concernant la fossilisation des Procaryotes thermophiles ou hyperthermophiles contraste avec l'intérêt croissant qu'on leur porte en tant que possibles analogues des formes de vie de l'Archéen inférieur, notamment les Bactéries photosynthétiques anoxygéniques et les Archées.

#### **1.3.2.1. Les Archées – Un domaine particulier du vivant**

Les Archées représentent un domaine entier dans l'arbre phylogénétique du vivant (Fig. 1-6). On y trouve une grande variété de micro-organismes, tous extrêmophiles. Pour cette capacité à vivre dans des environnements extrêmes pour nos standards (forte température, forte salinité, absence d'oxygène), leur organisation cellulaire très simple, ces Archées pourraient ressembler morphologiquement et physiologiquement aux toutes premières formes de vie présentes sur Terre.

Auparavant considérées comme un type de Bactéries (archéobactéries), la distinction entre les deux domaines n'a été mise en évidence que très récemment (Woese *et al.*, 1990). La distinction entre Bactéries et Archées se fait principalement par les différents types d'ARN ribosomal, et par la différence de leurs lipides membranaires. Ainsi, la membrane des Bactéries est constituée de diesters de diacyl D-glycerol, tandis que celle des Archées est à base de diéthers d'isoprénoïde L-glycerol (ou de tétraéthers de di-L-glycerol) (Kandler & König, 1998). Les longues chaînes lipidiques ne sont pas faites d'acides gras comme chez les Bactéries (et les Eucaryotes), mais de chaînes isopréniques comprenant de 20 à 40 carbones (Fig. 1-5). Autre différence avec les Bactéries, les Archées ne possèdent pas de muréine, un peptidoglycane qui donne la rigidité des parois de presque toutes les Bactéries. En remplacement, on trouve différents types de polymères (comme par exemple la

pseudomuréine chez *Methanopyrus*, la méthanochoandroïtine chez *Methanosarcina*, le glutamynglycane chez *Natrococcus*) (Kandler & König, 1998).

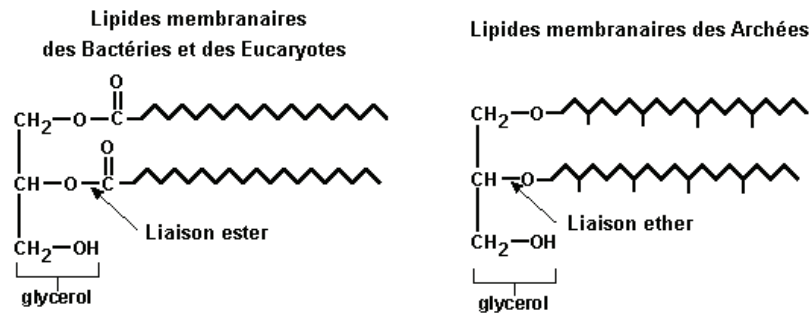


Fig. 1-5 : Structure des lipides membranaires des Eucaryotes, des Bactéries, et des Archées.

Toutefois, la majorité des Archées ne possèdent qu'une paroi de structure assez simple, avec une membrane plasmique, et une couche de surface (S-Layer). Cette dernière, quasi-omniprésente chez les Archées, est composée de protéines ou de glycoprotéines formant une structure paracristalline dont la structure varie selon les souches.

Comme cela a été évoqué précédemment (cf. paragraphe 1.2.1.2.), la paroi des micro-organismes joue un rôle primordial pour leur préservation et leur fossilisation. Avec leur membrane particulière, leur place discutée dans l'évolution du vivant, et le fait qu'elles n'aient auparavant pas fait l'objet d'une fossilisation expérimentale, les Archées constituaient des candidates privilégiées pour notre étude.

### 1.3.2.2. Intérêt pour les photosynthétiques anoxygéniques

Nous avons vu que les Archées sont considérées comme de possibles analogues des formes de vie primitives. Du côté des Bactéries, se pose le problème de l'origine de la photosynthèse. Les premières traces de vie identifiées dans les roches d'Afrique du Sud ou d'Australie (3,5 Ga) témoignent d'une grande diversité de micro-organismes. Les indices isotopiques ou géochimiques suggèrent qu'il existait déjà une grande variété de métabolismes, dont la photosynthèse anoxygénique (cf. paragraphes 1.1.3.1. et 1.3.1.). Les cyanobactéries ont été un temps considérées comme les premiers organismes photosynthétiques. Les plus anciennes traces de cyanobactéries datent de 2,5-2,6 Ga (Kazmierczak & Altermann, 2002). L'identification de cyanobactéries fossiles, plus anciennes, dans les roches de l'Apex Chert

(Pilbara, Australie, 3,5 Ga) a toutefois été remise en question récemment (Brasier *et al.*, 2002). Elles constituent encore aujourd'hui une grande partie de la population microbienne des sources chaudes.

Dans les années 1960 et 1970, un groupe important de micro-organismes photosynthétiques anoxygéniques thermophiles a été identifié : les Bactéries vertes non sulfureuses (*green non sulfur bacteria*, ou GNS), avec comme principal membre *Chloroflexus aurantiacus* (voir description paragraphe 2.1.1.3.). La présence de microfossiles filamenteux dans les roches de l'Archéen (Walsh, 1992 ; Westall *et al.*, 2006b), les indices phylogénétiques de l'apparition des pigments de ce phylum (bactériochlorophylles) antérieure aux pigments des phototrophes oxygéniques (Xiong *et al.*, 2000), et l'utilisation d'une voie métabolique particulière pour la fixation du carbone (le cycle 3-hydroxypropionate ; Herter *et al.*, 2002) concourent à faire de *C. aurantiacus* une souche à considérer dans la réflexion sur les origines de la vie et de la photosynthèse.

D'après le bilan fait par Hanada (2003), l'histoire ne semble pas être aussi simple. En effet s'il semble établi que le phylum des GNS s'est écarté des autres Bactéries bien avant les Bactéries pourpres et vertes, ces Bactéries possèdent le mécanisme photochimique des Bactéries pourpres, et le système collecteur des Bactéries vertes. Il semble donc qu'il y ait eu un certain nombre de mélanges (transferts horizontaux) entre les différents groupes de phototrophes. Les GNS restent de tout manière un groupe à part.

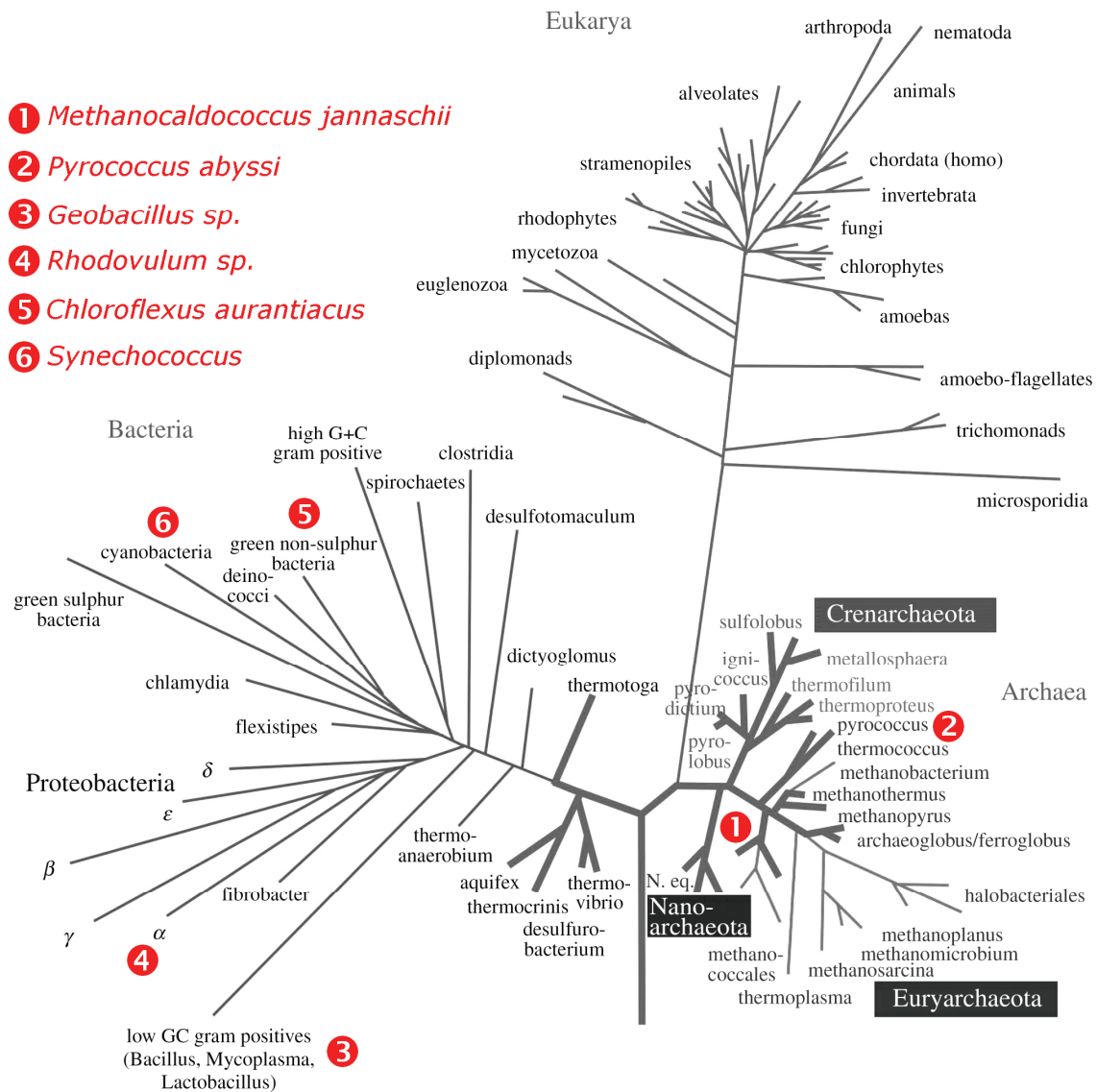
Du fait de la présence actuelle importante de cyanobactéries, et de la découverte relativement récente des GNS, l'interprétation des microfossiles a sans doute été biaisée. On a sans doute conclut trop rapidement à la présence de cyanobactéries, comme dans le cas de Schopf (1993). Celui-ci considère qu'environ un tiers des filaments du chert de l'Apex sont des Bactéries de type *Chloroflexus*, alors que les deux tiers suivants seraient probablement des cyanobactéries. Bien évidemment ce jugement doit être considéré avec précaution si l'on se réfère à la controverse avec Brasier *et al.* (2002). Au delà de ces controverses, Schultze-Lam *et al.* (1995) attribuent au moins à Schopf le mérite d'avoir replacé les Bactéries vertes dans le débat, comme type de micro-organismes potentiellement présent dans les enregistrements fossiles, alors qu'elles avaient plutôt été ignorées jusque là.

### **1.3.3. Critères pour le choix des micro-organismes**

Avec l'objectif de fossiliser des micro-organismes actuels, qui auraient pu se développer dans les conditions supposées de la Terre primitive, les souches utilisées lors de ces études devaient dans la mesure du possible répondre aux critères suivants :

- **Anaérobie stricte** : L'atmosphère de la Terre primitive était constituée principalement de CO<sub>2</sub>, la quantité d'oxygène alors présente dans l'atmosphère était certainement très faible (avec une pO<sub>2</sub> de 2.10<sup>-3</sup> atm ; Rye *et al.*, 1995). Les premières formes de vie étaient donc très certainement anaérobies. Le pourcentage d'oxygène dans l'atmosphère a grimpé en flèche vers 2,0 Ga, à la suite du développement des micro-organismes photosynthétiques (Olson *et al.*, 2006). Malgré cela, il existe encore aujourd'hui toute une variété d'environnements anoxiques (sédiments, océans), où se développent des micro-organismes. Cependant, l'anaérobie stricte ne se trouve que chez les Procaryotes, quelques champignons et quelques protozoaires.
- **Thermophilie, voire hyperthermophilie** : Selon les analyses de l'isotope de l'oxygène  $\delta^{18}\text{O}$  des roches du Précambrien, la température de l'océan de la Terre primitive était plus élevée qu'actuellement, soit entre 50 et 80°C (Knauth & Lowe, 2003). Des variations locales étaient possibles, avec des températures encore plus élevées dans les environnements hydrothermaux. La température de l'océan primitif et son évolution pendant la suite du Précambrien sont toujours sujettes à débat (Robert & Chaussidon, 2006 ; Shields & Kasting vs Robert & Chaussidon, 2007). Au delà de 65°C, seuls les organismes Procaryotes peuvent survivre. Ces organismes répartis entre Archées et Bactéries, présentent une grande diversité et se retrouvent dans tous les environnements chauds actuels (sources chaudes principalement). Les micro-organismes hyperthermophiles occupent la base de l'arbre du vivant, permettant à certains auteurs (Stetter, 2006) de suggérer une origine hyperthermophile de la vie.
- **Type Gram-négatif (pour les Bactéries)** : Une distinction existe parmi les Bactéries entre les Gram-positives et les Gram-négatives, témoignant de structures de paroi différentes (Fig. 1-7). Une distinction similaire existe chez les Archées, mais elle est moins discriminante du fait de la grande variété de structures de parois chez ces organismes. La majorité des Archées (dont *M. jannaschii* et *P. abyssi*) sont Gram-négatives avec une paroi uniquement composée d'une membrane plasmique et d'une couche de surface de protéines (S-Layer, Fig. 1-7) (Kandler & König, 1998). Quelques Archées (*Methanothermus*, *Methanobacterium* par exemple) possèdent une paroi

rigide et sont considérées comme Gram-positives (König, 2001). Pour cette étude, le critère Gram-négatif n'a été pris en compte que pour les Bactéries : les Bactéries Gram-positives sont apparues plus tardivement au cours de l'évolution, et n'occupent qu'un petit embranchement du domaine des Bactéries dans l'arbre phylogénétique du vivant (Fig. 1-6).



**Fig. 1-6 : Arbre phylogénétique du vivant (modifié à partir de Stetter, 2006), établi à partir des petites sous-unités de l'ARN ribosomal (*small subunit ribosomal RNA*). La place des différents micro-organismes utilisés lors de cette étude est indiquée.**

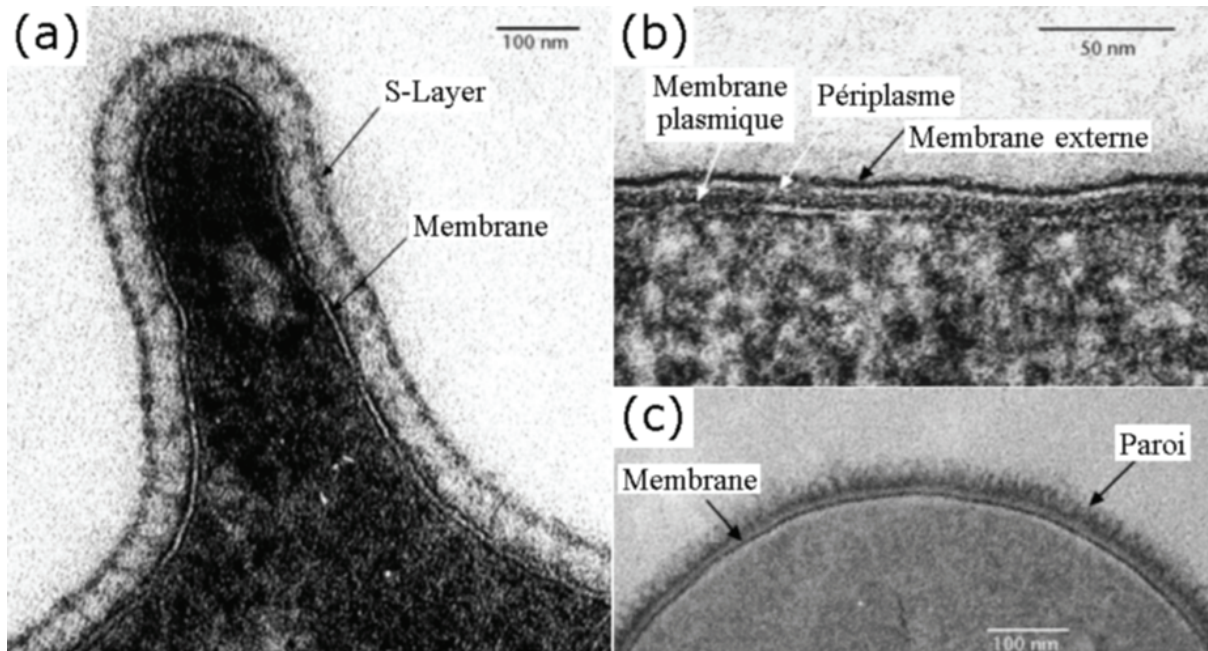


Fig. 1-7 : Exemple de structure de paroi chez les Procaryotes. (a) Paroi d'une Archée dans le cas le plus simple, avec seulement une S-Layer et une membrane plasmique (adapté de Beveridge, 2002). (b) Paroi d'une Bactérie Gram-négative (adapté de Beveridge, 2001). (c) Paroi d'une Bactérie Gram-positive (adapté de Beveridge, 2001).

Il existe encore d'autres critères appréciables mais facultatifs :

- Optimum de croissance dans un **pH légèrement acide**. La haute teneur en  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère primitive (cent fois sa teneur actuelle ; Kasting, 1993 ; Rye *et al.*, 1995) et donc de l'océan a pu rendre ce dernier légèrement acide, avec un pH compris entre 5 et 7.
- **Vie marine**. Les premières formes de vie sont apparues dans les océans. Certains auteurs (Knauth, 1998) avancent une salinité des océans de la Terre primitive jusqu'à deux fois supérieure à la valeur actuelle, qui est en moyenne de 35 ‰ (De Ronde *et al.*, 1997). Cependant les eaux salées n'ont pas le monopole des environnements analogues à ceux de la Terre primitive : les sources chaudes terrestres sont un exemple de milieu d'eaux douces (bien que fortement minéralisées) présentant de fortes températures.
- Croissance en eaux peu profondes. Les sédiments riches en microfossiles du début de l'Archéen venant d'Australie (Pilbara) et d'Afrique du Sud (Barberton) se sont déposés dans des eaux de faible profondeur.
- **Autotrophie**, c'est à dire capable de n'utiliser que le  $\text{CO}_2$  comme source de carbone pour son métabolisme. Les premières formes de vie n'avaient à leur disposition comme source d'énergie et de carbone que les substances minérales dissoutes ou en

suspension dans les océans. Mais ce n'est pas un critère absolu : l'hétérotrophie a pu se développer rapidement, à mesure que la vie colonisait la Terre primitive.

Ces critères témoignent de la vision d'ensemble que l'on se fait de la Terre primitive. Ils ont donc un certain caractère spéculatif, et ne tiennent pas compte des variations locales qui pouvaient exister.

### 1.4. Evolution de la démarche au cours de cette étude

La sélection des micro-organismes pour cette étude n'a pas été arrêtée en une seule fois avant le lancement des fossilisations expérimentales. Pour comprendre les raisons de nos choix, il convient de présenter nos objectifs initiaux, et les révisions intervenues ultérieurement.

Les travaux réalisés dans cette étude ont été initiés lors d'un DEA, qui a permis de se familiariser avec les techniques de cultures des micro-organismes hyperthermophiles. Durant la préparation de ce DEA, deux souches (la Bactérie hyperthermophile sulfuro-réductrice *Desulfurobacterium thermolithotrophum* ainsi que l'Archée hyperthermophile méthanogène *Methanocaldococcus jannaschii*) ont été fossilisées expérimentalement pendant un mois, avec un mode opératoire similaire à celui qui sera présenté ci-après. Elles ont été choisies suivant les critères présentés dans le paragraphe précédent.

Cette première fossilisation expérimentale constituait donc une prise de contact, une initiation aux indispensables techniques de microbiologie, et de microscopie électronique. Malgré des résultats qui demandaient confirmation, les observations réalisées par microscopie électronique laissaient entrevoir une fossilisation réussie des cellules de *M. jannaschii*, avec un dépôt de particules de silice sur les différentes épaisseurs de sa membrane.

Dans l'objectif de confirmer ces résultats, nous avons alors envisagé de continuer à travailler avec *M. jannaschii* en étudiant de la manière la plus exhaustive possible sa fossilisation expérimentale. Comme cela a été exposé dans le paragraphe 1.3.2., la fossilisation expérimentale des Archées n'avait jamais été réalisée.



La première série d'expériences réalisée comprend ainsi une fossilisation expérimentale de *M. jannaschii* dans la silice, avec des temps d'incubation étalés sur une année, avec comme objectif l'observation par microscopie électronique et l'analyse de la préservation, ou dégradation des constituants organiques (lipides, sucres, acides aminés).

Après cette première série d'expériences, il était prévu d'étudier de la même manière la fossilisation de *M. jannaschii* avec d'autres minéraux, comme par exemple du carbonate de calcium, ou des oxydes de fer.

Cependant, les premiers résultats de la fossilisation de *M. jannaschii*, avec l'absence de fossilisation des cellules, nous ont amenés à une remise en cause. Il s'agissait alors de savoir si cette absence de fossilisation était due à la souche elle-même (qui ne pouvait pas être préservée), ou à un quelconque défaut du mode opératoire.

L'étude de la fossilisation de *M. jannaschii* avec d'autres minéraux a donc été mise de côté. L'étude de la silicification expérimentale a toutefois été complétée, une nouvelle série de fossilisations expérimentales ayant été réalisée pour tenter de comprendre ce qui s'était passé avec *M. jannaschii*.

Après cette première série d'observations, l'un des objectifs était de prouver que la fossilisation des Archées était possible, ou non. Une série de courtes fossilisations expérimentales (prévue pour 1 mois à l'origine) avec différentes souches d'Archées et de Bactéries, dans des conditions expérimentales différentes devait permettre de répondre à ces questions.

Pour savoir si cette non-fossilisation était due aux caractéristiques propres de cette espèce, nous avons essayé de silicifier d'autres souches plus ou moins proches, en suivant le même protocole. Parmi les souches choisies, il y avait une autre Archée hyperthermophile (*Pyrococcus abyssi*) – pour comparaison avec *M. jannaschii* et pour savoir si la fossilisation des Archées était possible –, les Bactéries *Chlorobaculum tepidum* (comme représentante des Bactéries photosynthétiques anoxygéniques) et *Geobacillus sp.* (afin de compléter le tour d'horizon des micro-organismes thermophiles, avec une Bactérie Gram-positive). La Bactérie photosynthétique non thermophile *Rhodovulum sp.* a quant à elle été utilisée pour mettre au point les protocoles expérimentaux. Ainsi, portant au départ sur l'étude approfondie de la fossilisation de *M. jannaschii*, la problématique initiale a donc évolué vers une étude de la silicification expérimentale des micro-organismes thermophiles.

Enfin, afin de tenter de déterminer si le mode opératoire pouvait être mis en cause, nous avons également fossilisé expérimentalement *M. jannaschii* selon différents protocoles

basés sur les précédentes expériences qui avaient donné des résultats probants, ou encore en faisant varier certains paramètres.

A la suite des études qui avaient montré qu'une fixation préalable de fer sur les parois des micro-organismes pouvait faciliter la silicification (Ferris *et al.*, 1988 ; Fein *et al.*, 2002), nous avons aussi cherché à savoir si ces conclusions pouvaient être appliquées à *M. jannaschii*. Pour cela, il fallait dans un premier temps déterminer si les cellules de *M. jannaschii* étaient effectivement capable d'adsorber des cations métalliques, comme cela avait déjà été mis en évidence pour les Bactéries Gram-positives (Beveridge & Murray, 1976) et Gram-négatives (Beveridge & Koval, 1981).

En plus de *M. jannaschii*, nous souhaitions également dès le départ étudier la fossilisation d'une Bactérie photosynthétique anoxygénique. *Chloroflexus aurantiacus* a d'abord été choisie à cette fin. Toutefois la difficulté de sa culture en laboratoire nous a finalement conduits à opter pour la Bactérie verte sulfureuse *Chlorobaculum tepidum* (Wahlund *et al.*, 1991), tandis que le prélèvement sur le terrain de tapis microbiens de *C. aurantiacus* a été planifié. Des problèmes ayant encore été rencontrés pour la culture de *C. tepidum* en laboratoire, l'étude de la fossilisation des Bactéries photosynthétiques a finalement été réalisée sur des tapis microbiens contenant *C. aurantiacus*, et prélevés dans le Parc National de Yellowstone (Wyoming, Etats-Unis).

La majeure partie des sources du Parc National de Yellowstone présente en effet dans leurs bassins ou leurs effluents des colonies de micro-organismes thermophiles pouvant former des tapis. La diversité microbienne a été mise en évidence et abondamment étudiée depuis les travaux de Thomas Brock, à partir des années 1960. Les différentes espèces de micro-organismes se répartissent en fonction de la température de l'eau. A mesure que l'on s'éloigne de la source, et avec la baisse de la température de l'eau, on trouve successivement des micro-organismes hyperthermophiles (Archées, comme *Thermus aquaticus*), les thermophiles (dont *C. aurantiacus*), puis des mésophiles. D'une manière générale, la couleur du tapis (qui dépend des pigments chlorophylliens présents), permet à l'œil entraîné de déterminer le type de micro-organismes formant le tapis, et la température de l'eau à cet endroit (à l'intérieur de la gamme de températures supportées par ces micro-organismes).

Parmi l'ensemble des sources chaudes de Yellowstone, seules quelques-unes possèdent des tapis microbiens où *C. aurantiacus* est présente. Octopus Spring (anciennement appelée Pool A), dans le *Lower Geyser Basin*, est l'une d'entre elles (Pierson & Castenholz, 1974). Brock y a mené ses premières études, et de fil en aiguille, Octopus Spring est devenue

## *Introduction*

l'une des sources les plus étudiées, les plus documentées, grâce à ses travaux (Brock, 1978), à ceux de David Ward et de tous leurs collaborateurs et étudiants (résumé dans Ward *et al.*, 1998). Cette documentation a été d'une grande aide pour la préparation de la campagne de prélèvements sur le site.

## **Seconde partie : Matériels et Méthodes**

### **2.1. Souches microbiennes utilisées**

#### **2.1.1. Présentation des différentes souches de micro-organismes utilisées pour la fossilisation expérimentale**

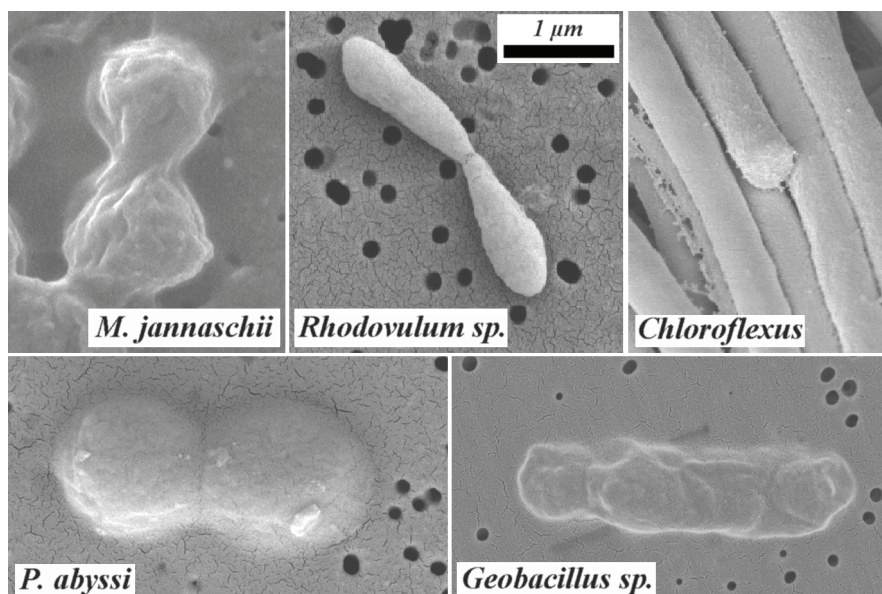


Fig. 2-1 : Micrographies MEB des souches utilisées pour la fossilisation expérimentale. Toutes les images sont à la même échelle.

##### **2.1.1.1. Methanocaldococcus jannaschii (Archée méthanogène hyperthermophile)**

*Methanocaldococcus jannaschii* a été isolée sur un prélèvement de cheminée hydrothermale, au niveau de la dorsale est-Pacifique, à proximité de la pointe de la Basse Californie (Mexique), à une profondeur de 2500 mètres (Jones *et al.*, 1983). C'est une Archée méthanogène, autotrophe, hyperthermophile, comme on en trouve un certain nombre dans le domaine des Archées. Elle se présente sous la forme de coques irrégulières, avec des plissures dans sa paroi évoquant la forme d'un grain de raisin sec, de taille légèrement inférieure au micron (Fig. 2-1). Elle peut se développer entre 45 et 86°C, avec un optimum à 80°C.

Sa paroi est constituée d'une membrane cytoplasmique, et d'une S-Layer d'environ 20 nm d'épaisseur (Jones *et al.*, 1983 ; König, 2001) (Fig. 1-7a). Elle possède deux faisceaux de

flagelles polaires. Cependant ces flagelles n'ont jamais été observés en microscopie électronique lors des fossilisations expérimentales, que ce soit au MEB ou au MET.

*M. jannaschii* est le premier membre du domaine des Archées à avoir eu son génome entièrement séquencé (Bult *et al.*, 1996). Depuis son identification (Jones *et al.*, 1983), *M. jannaschii* était classée dans le genre des *Methanococcus*. Cependant, afin de mieux séparer les souches thermophiles et mésophiles de ce genre, une partie des espèces a été répartie dans un nouveau genre, *Methanocaldococcus* (noter l'ajout du « *caldo* », pour chaleur), avec *Methanocaldococcus jannaschii* comme souche type (Whitman, 2001).

#### 2.1.1.2. *Pyrococcus abyssi* (Archée hyperthermophile)

Comme *M. jannaschii*, l'Archée hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* a été identifiée au niveau des sources hydrothermales. Elle a été isolée dans une cheminée hydrothermale, prélevée à 2000 mètres de profondeur dans le Bassin Nord Fidji (Océan Pacifique) (Erauso *et al.*, 1993).

C'est une Archée marine, chimioorganotrophe stricte. Elle est capable de se développer à des températures comprises entre 67 et 102°C, avec un optimum à 96°C, pour un pH neutre. Pour cette étude, les cultures ont été faites à 85°C. Les cellules de *P. abyssi* sont des coques de 0,8 à 2 µm (Fig. 2-1). En pratique, la grande majorité des cellules observées avaient moins de 1 µm de diamètre. N'ont pas non plus été observées les « cellules géantes » de 5 µm de diamètre qui se forment occasionnellement (Erauso *et al.*, 1993), hormis ponctuellement lors du suivi des cultures en microscopie optique. La structure de la paroi est similaire à celle de *M. jannaschii*, avec une membrane cytoplasmique, entourée d'une double S-Layer (Erauso *et al.*, 1993 ; König, 2001).

Dans leur environnement naturel, *M. jannaschii* et *P. abyssi* sont soumises à une énorme pression hydrostatique (entre 200 et 300 fois la pression atmosphérique). Cependant, et de manière surprenante, elles sont parfaitement capables de se développer à la pression atmosphérique. Ce sont donc des micro-organismes barophiles facultatifs. Mais les fortes pressions accélèrent leur croissance.

### **2.1.1.3. *Chloroflexus aurantiacus* (Bactérie filamenteuse, photosynthétique anoxygénique)**

*Chloroflexus aurantiacus* est la première souche photosynthétique anoxygénique thermophile à avoir été isolée par Pierson & Castenholz (1974), à la suite de différentes observations de tapis microbiens de Yellowstone, du Japon, ou de Nouvelle-Zélande. Après sa découverte, on s'est rendu compte qu'elle était différente des autres Bactéries vertes, formant son propre phylum, et présentant des voies métaboliques propres (comme la fixation autotrophique du carbone par la voie hydroxypropionate, Herter *et al.*, 2002).

Les analyses phylogénétiques ont montré que le groupe des GNS (*Green Non Sulfur Bacteria*) s'est différencié des autres Bactéries bien avant les Bactéries vertes ou les Cyanobactéries (Oyaizu *et al.*, 1987). De ce fait, on a suggéré que cette voie hydroxypropionate pouvait être à l'origine de la photosynthèse anoxygénique (Madigan, 2003). Le phylum des Bactéries vertes non sulfureuses (GNS) est désormais appelé *Chloroflexi*. Le genre *Chloroflexus* représente à ce jour les micro-organismes photosynthétiques anoxygéniques les plus thermophiles, avec des souches poussant jusqu'à 70°C (Hanada, 2003).

Différentes variétés de *C. aurantiacus* existent suivant la localisation et présentent de légères variations de taille et de températures de croissance. Ainsi l'holotype (ou variété référence, J-10-fl), qui provient du Japon, forme des filaments de 0,6-0,7 µm de large, et pousse autour de 55°C à pH 7,5. Les filaments ont une longueur indéterminée (qui peut atteindre plusieurs centaines de microns), et sont formés de cellules de 2 à 6 µm de longueur. Les filaments de la souche présente à Octopus Spring (Y-400-fl) sont légèrement plus larges (environ 0,8 µm ; Fig. 2-1), et poussent à des températures et pH légèrement plus élevés (59°C en moyenne, 8,5) (Pierson & Castenholz, 1974).

D'autres bactéries filamenteuses cohabitent avec *C. aurantiacus*, et présentent peu ou prou les mêmes caractéristiques morphologiques. Ces autres bactéries, appartenant aux genres *Roseiflexus* et *Heliothrix*, appartiennent également au phylum des GNS. Ainsi *Roseiflexus castenholzii* (Hanada *et al.*, 2002) présente, tout comme *C. aurantiacus*, des filaments de moins d'un micron de diamètre, et pousse dans les mêmes conditions de température et de pH que *C. aurantiacus* (entre 48°C et 68°C, pH autour de 8). La confusion est donc possible. Pour cet exposé, le terme générique *Chloroflexus* sera utilisé pour désigner toutes ces

bactéries filamenteuses, dont il est impossible de déterminer la nature exacte à partir des seules observations en microscopie optique ou électronique.

Les membres du genre *Chloroflexus* possèdent comme pigments les bactériochlorophylles a et c. (BChl a, BChl c). La BChl c est contenue dans des chlorosomes (vésicules intracellulaires). A noter que les souches des genres *Heliothrix* et *Roseiflexus* ne possèdent pas ces chlorosomes, ce qui peut éventuellement fournir un critère de distinction (Hanada, 2003). *C. aurantiacus* est donc capable de photosynthèse anoxygénique. Cette photosynthèse est le plus souvent hétérotrophe, mais peut aussi se faire en autotrophie quant *C. aurantiacus* pousse seule. D'autre part, *C. aurantiacus* peut également se passer de lumière et fonctionner par chimiohétérotrophie (Pierson & Castenholz, 1974).

#### **2.1.1.4. *Geobacillus* sp. (Bactérie thermophile Gram-positive)**

L'étude de la fossilisation de cette souche était motivée par la volonté d'avoir une vue d'ensemble de la fossilisation chez les thermophiles, après avoir étudié les Archées et les Bactéries Gram-négatives.

La souche fournie par le Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (Brest) n'est pas encore identifiée formellement. Les premières études ont indiqué qu'elle se rapprochait de la souche *Geobacillus caldoxylosilyticus* (Ahmad *et al.*, 2000 ; Fortina *et al.*, 2001). Elle a été trouvée dans des prélèvements faits dans les sources chaudes de l'Île Saint-Paul (Terres Australes et Antarctiques Françaises).

*Geobacillus* sp. est une Bactérie Gram-positive, formant des bâtonnets de 0,8-0,9 µm de largeur, pour 2-3 µm de longueur (Fig. 2-1). Les cellules présentent une endospore ovale. Cette endospore est visible en microscopie optique, sous la forme d'un point brillant au milieu des cellules. Les cultures ont une couleur jaune vif. Son optimum de croissance se trouve à une température de 65°C pour un pH neutre. C'est une Bactérie anaérobie facultative et hétérotrophe.

#### **2.1.1.5. *Rhodovulum* sp. (Bactérie Gram-négative non thermophile)**

*Rhodovulum* sp. ne correspond pas aux critères déterminés pour le choix des souches pour cette étude sur la fossilisation expérimentale. Cette souche n'est en effet pas

thermophile, n'a pas été cultivée en autotrophie, et ne nécessite pas d'anaérobie stricte pour sa culture. Cependant, elle nous a permis de tester la culture des bactéries phototrophes, et les différents protocoles de silicification expérimentale. Malgré l'absence de lien entre *Rhodovulum sp.* et notre problématique, les résultats de sa fossilisation expérimentale furent intéressants, et ont fourni un très bon élément de comparaison et d'explication pour les résultats des fossilisations expérimentales de ses camarades thermophiles.

Cette souche est capable de photosynthèse anoxygénique en utilisant le Fer (II) comme donneur d'électron. En culture, la densité cellulaire est très élevée et forme un trouble de couleur jaune-brun. Un dépôt de la même couleur (Fer (III)) apparaît progressivement au fond des flacons de culture.

Les cellules ont une forme ovoïde ou en bâtonnets, de 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  de largeur, pour longueur comprise entre 2 et 4  $\mu\text{m}$  (Fig. 2-1). Elles poussent à température ambiante, à pH 6,5.

## **2.1.2. Culture des micro-organismes**

### ***2.1.2.1. Culture des Archées hyperthermophiles, en anaérobie***

La culture des micro-organismes hyperthermophiles anoxygéniques requiert un certain nombre de précautions et de méthodes particulières. Le souci majeur est d'éviter que les micro-organismes cultivés ne soient en contact avec l'oxygène de l'air ambiant, qui est pour eux un poison. Les cellules doivent donc en permanence être dans un milieu débarrassé de son oxygène, aussi bien le milieu liquide dans lequel elles se développent, que l'atmosphère.

Pour la manipulation en routine des cultures, la technique utilisée est celle décrite par Balch & Wolfe (1976). Les flacons de culture sont de taille diverses (de 20 à 500 mL) et fermés par un septum. Une rampe à gaz permet de les débarrasser de l'oxygène qu'ils contiennent. Une série de vides et de remplissages à l'azote permet de dégazer le milieu liquide ainsi que l'atmosphère du flacon. A la fin, on laisse une légère surpression dans le flacon, afin qu'aucun gaz extérieur ne pénètre. Dernière précaution en ce qui concerne l'anaérobie : l'utilisation d'un colorant (la résazurine) qui indique si l'anaérobie est respectée. Il est incolore en l'absence d'oxygène, et se colore en rose si l'anaérobiose est rompue. Pour



les manipulations délicates, il est possible d'utiliser une chambre anaérobie, remplie d'azote, et munie d'un détecteur d'oxygène.

Enfin la culture de ces organismes nécessite les précautions habituelles inhérentes à la contamination des cultures par d'autres bactéries. Le problème n'est pas tant la contamination par les bactéries présentes dans l'environnement ambiant : les fortes températures de cultures requises assurent qu'elles ne proliféreront pas dans les échantillons. En revanche, la manipulation simultanée de plusieurs souches thermophiles ou hyperthermophiles peut être un facteur de contamination.

Voici ci-après la composition des milieux de culture, et les détails de la préparation de culture pour chaque souche :

### ***Methanocaldococcus jannaschii***

*M. jannaschii* a été cultivée dans un milieu autotrophique pauvre. Ce milieu contenait (par litre d'eau distillée) 25 g de NaCl, 3 g de MgCl<sub>2</sub>, 1 g de NH<sub>4</sub>Cl, 0,15 g de CaCl<sub>2</sub>, 0,5 g de KCl, 0,3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, et 0,001 g de résazurine. Le pH a été ajusté à 6,5, puis le milieu a été stérilisé par un passage en autoclave. En fonction de l'usage envisagé, des volumes de 20 mL ou 500 mL de milieu ont été répartis dans des fioles stériles. L'anaérobiose a été obtenue en faisant le vide dans les fioles, puis en les saturant avec du diazote (N<sub>2</sub>) (d'après les techniques de Balch & Lowe, 1976), et en le remplaçant par un mélange de H<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> (proportions 80:20 ; 300 kPa). Enfin, le milieu a été réduit par l'ajout de 0,2 mL d'une solution stérile de Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O à 10% (wt/vol) dans chaque fiole.

Les cultures de *M. jannaschii* ont été obtenues à partir de cultures anciennes conservées au froid. Cependant le milieu appauvri s'est avéré insuffisant pour relancer ces cultures. Ainsi, il a été décidé d'utiliser pour cette première étape un milieu un peu plus riche, de composition identique au milieu appauvri, mais avec l'ajout de 3,46 g de PIPES (piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)), et de 0,5 g d'extrait de levure. Après avoir obtenu de nouvelles cultures, celles-ci pouvaient alors servir d'inoculum pour des cultures en milieu pauvre.

Le milieu a été inoculé à une concentration finale de 2 % et incubé à 80°C dans une étuve avec agitation (140 rpm). La croissance microbienne a été suivie par observation avec un microscope à contraste de phase (Olympus CX-40).

La fin de la phase exponentielle était en général obtenue au bout de 24 à 36 heures d'incubation. En raison de l'utilisation d'un milieu autotrophe pauvre, la densité bactérienne finale n'était pas élevée. Si la culture était prolongée au delà de cette phase exponentielle, la culture devenait rapidement moribonde, avec la mort en quelques jours de la majorité des cellules.

### *Pyrococcus abyssi*

*P. abyssi* (souche GE5, préparée à partir d'une culture de GE5a TAA (tout acides aminés) + U (uracyle) fournie par Mathieu Gonet et datant de janvier 2003) a été cultivée dans le milieu décrit par Geslin *et al.* (1996), avec de légères modifications. Ce milieu contenait (par litre d'eau distillée) 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,2 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{KCl}$ , 0,83 g de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 5 g d'extrait de levure, 5 g de bio-Trypcase, 20 g de  $\text{NaCl}$ , 3,45 g de piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES), et 0,001 g de resazurine. Le pH a été ajusté à 7, puis le milieu a été stérilisé par un passage en autoclave. 5 mL d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 6% (wt/vol) et 5 mL d'une solution de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à 6% (wt/vol) ont été ajoutés. Le milieu était ensuite réparti par dose de 20 mL dans des fioles stériles, de 50 mL, auxquelles on rajoutait environ 0,2 g de soufre élémentaire en poudre, préalablement stérilisé. L'anaérobiose a été obtenue en faisant le vide dans les fioles, puis en les saturant avec du diazote ( $\text{N}_2$ ) (d'après les techniques de Balch & Lowe, 1976). Enfin, le milieu a été réduit par l'ajout de 0,2 mL d'une solution stérile de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  à 10% (wt/vol) dans chaque fiole.

Le milieu a été inoculé à une concentration finale de 3% et incubé à 90°C dans une étuve avec agitation. La croissance microbienne a été suivie par observation avec un microscope à contraste de phase (Olympus CX-40). La fin de la phase exponentielle était en général obtenue au bout d'une douzaine d'heures d'incubation, pour une densité cellulaire finale extrêmement élevée.

Pour vérifier l'impression laissée par la microscopie optique que des cellules étaient encore vivantes après 1 mois de fossilisation, 2 mL des échantillons fossilisés pendant un mois ont été prélevés et injectés dans de nouvelles fioles avec du milieu de culture frais. Une croissance à peine plus lente que la normale a été observée.

### 2.1.2.2. Culture des autres micro-organismes

#### ***Rhodovulum sp.***

Les cultures proviennent de la souche TH2101 (*Rhodovulum sp.*) isolée dans l'étang de Thau, fournie par le Laboratoire d'Ecologie Moléculaire de l'Université de Pau.

Le milieu de culture contenait (par litre d'eau distillée) 0,25 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,05 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 g de  $\text{NaCl}$ , 2 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,8 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g d'extrait de levure, 1 mL d'une solution d'oligo-éléments SL12 (dans 1 L d'eau distillée : 3 g d'EDTA-di-Na, 1,1 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 190 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 42 mg de  $\text{ZnCl}_2$ , 18 mg de  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 24 mg de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 300 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2 mg de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Après autoclavage, ont été rajoutés dans le milieu : 0,25 mL de mélange de vitamines (V7) et 30 mL de d'une solution de  $\text{NaHCO}_3$  à 5 g/L. Le pH a ensuite été ajusté à 7,0.

Ce milieu est ensuite réparti par doses de 20 mL dans des fioles scellées. De l'acétate a été utilisé comme substrat et injecté dans chaque fiole pour une concentration finale de 10 mM, puis les fioles ont été inoculées à 10% (2 mL d'inoculum pour 20 mL de milieu). Les cultures ont été laissées à température ambiante, sur un rebord de fenêtre pour permettre une exposition à la lumière naturelle, sans agitation. Au bout d'une semaine, la culture passe de la couleur jaune foncé translucide à marron foncé (rouille, présence de fer), et montre une forte densité cellulaire au microscope optique.

#### ***Geobacillus sp.***

Le milieu de culture utilisé est un milieu 162 (ordinairement utilisé pour la culture de *Thermus* ou de *Bacillus*) modifié comme suit : à 880 mL d'eau distillée, on ajoute, 100 mL de la solution Base A (par litre d'eau distillée : 1,32 g de Tritriplex I (acide nitrilotriacétique), 2 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,40 g de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5 mL d'une solution d'éléments traces (voir ci-après), et 5 mL d'un solution de citrate de Fer (pH ajusté à 7,2), 2,5 g de levure, 2,5 g de Tryptone. La solution d'éléments traces contient (par litre d'eau distillée) 12,80 g de Titriplex I (acide nitrilotriacetic), 1 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,50 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,30 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,20 g de  $\text{ZnCl}_2$ , 0,05 g de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g de  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 0,02 g de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  avec un pH ajusté à 6,0-6,5. La solution de citrate de Fer contient (par litre d'eau distillée) : 2,94 g de  $\text{Na}_3$  citrate  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2,70 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Le milieu de culture est autoclavé et son pH est ajusté à 7,2.

Les milieux ont été inoculés et incubés à 72°C dans une étuve avec agitation. Durant de la culture, la croissance a été interrompue lors du rapatriement des échantillons fossilisés à Orléans. Les bactéries ont donc été soumises à des températures variables au cours de leur croissance, ainsi qu'à un possible dépassement de la phase exponentielle de croissance. Ceci expliquerait le nombre important de cellules dégradées observées par microscopie électronique.

### **2.1.3 Prélèvement de tapis bactériens à Octopus Spring (Parc National de Yellowstone)**

#### ***2.1.3.1. Description de la source***

Octopus Spring se trouve dans le *Lower Geyser Basin*, une des zones principales du Parc regroupant des manifestations hydrothermales, qui se situe au bord de la Firehole River à une dizaine de kilomètres au nord du geyser Old Faithful.



**Fig. 2-2 : Photo d'Octopus Spring prise lors de la campagne de prélèvement d'Août 2006.**

Octopus Spring présente un bassin principal important, faisant environ 6 mètres de diamètre. La source est située sur le côté de ce bassin principal. L'eau y sort à une température de 93°C. Son pH est voisin de 8, pour une concentration en silice de 140-150 ppm. Une ébullition est visible à mesure que l'eau remonte des profondeurs, du fait de la baisse de pression. Le pourtour du bassin principal est délimité par des concrétions circulaires

en silice (*sinters*). Elles sont continues lorsqu'elles délimitent le bassin principal du terrain environnant, et discontinues entre ce bassin principal et les bassins secondaires. La croissance de ces *sinters* est très lente, les photos d'Octopus Spring prises à plusieurs années d'intervalle ne montrent pas d'évolution visible dans la taille et la répartition de ces concrétions.

L'eau s'évacue de la source par deux chenaux. L'un part directement de l'endroit d'où l'eau jaillit, tandis que l'autre débute à l'autre extrémité du bassin. Le premier court en torrent sur plusieurs dizaines de mètres à partir de la source dans une rigole de 50 cm de large environ. Le second fait de même sur quelques mètres avant d'atteindre une zone plus plate. Le flux d'eau s'épanche alors et recouvre toute la surface. Un tapis bactérien présentant des couleurs, et donc des espèces différentes s'y est développé. Des photos de ce tapis prises à plusieurs années d'intervalles ont montré sa progression et son évolution (Figs. 2-2 et 2-3).

Dans les zones où la température de l'eau est comprise entre 42 et 74 °C, on trouve les tapis microbiens incluant les filaments de *Chloroflexus*. La structure de ce tapis est à première vue assez simple :

- à la surface, une couche verte d'environ 1 mm d'épaisseur ;
- en-dessous, une couche rouge-orange d'épaisseur variable (de quelques millimètres à quelques centimètres).

Les premières descriptions de ce tapis ont identifié deux souches principales : la cyanobactérie *Synechococcus lividus* dans la couche verte (pour cette raison, ce type de tapis est parfois dénommé « *cyanobacterial mat* » dans la littérature), et *C. aurantiacus* dans la couche rouge. Toutefois, la limite couche verte / couche rouge n'en est pas vraiment une au niveau microbien. La couche verte compte en effet un grand nombre de filaments de *Chloroflexus*, tandis que *Synechococcus* est présente sporadiquement dans la couche rouge (Doemel & Brock, 1977).

La couche verte de cyanobactéries bloque une bonne partie de la lumière qui arrive au tapis, n'en laissant passer qu'environ un quart qui est utilisée par le haut de la couche orange-rouge du tapis à *Chloroflexus*. Dans les conditions de luminosité idéales, la lumière ne pénètre que sur les deux premiers millimètres du tapis (Doemel & Brock, 1977).

Ainsi, on ne trouve des filaments de *Chloroflexus* vivants que dans les premiers millimètres du tapis, et des filaments moribonds ou morts (vides) en dessous. Cette zone profonde (quand elle existe) abrite également de nombreux micro-organismes hétérotrophes.

D'autres bactéries sont également présentes dans ce tapis (Ward *et al.*, 1998). En plus de *C. aurantiacus*, on trouve parmi les GNS *Thermomicrobium roseum* et *Roseiflexus castenholzii*. Sont présents également des Planctomycètes (*Isosphaera pallida*), des Proteobactéries, des Spirochètes, diverses Bactéries Gram-positives (*Heliobacterium modesticaldum*, *Thermoanaerobacter brockii* et *ethanolicus*, *Thermobacteroides acetoethylicus*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Moorella thermoautotrophica*), ainsi qu'une multitude de souches bactériennes encore non-identifiées, dont la présence est suspectée par leur signal d'ARN 16S.

Depuis son identification au XIX<sup>ème</sup> siècle, Octopus Spring est restée stable, avec un débit constant. La comparaison des images de la source lors de ces dernières années ne montre en effet pas de changements significatifs de la structure de la source et de ses bassins. La seule différence notable concerne un tapis microbien situé en aval d'un chenal sortant au fond du bassin principal (ci-après dénommé « Site n°2 »). Ce tapis se situe actuellement à environ 5 mètres du bassin. Des images plus anciennes ont montré qu'il se situait auparavant bien plus en aval sur ce chenal (Fig. 2-3), et qu'il a progressivement migré. Cette évolution est sensible sur des photographies prises à seulement quelques années d'intervalle.



**Fig. 2-3 : Vue ancienne d'Octopus Spring (tirée de Ward *et al.*, 1998). La date de la prise de vue est inconnue, mais remonte au moins à une dizaine d'années. Noter la position du tapis bactérien (flèche) bien plus en aval qu'observé en 2006 (comparer avec la Fig. 2-2).**

L'épaisseur du tapis microbien reste constante. La croissance (entre 30 et 60  $\mu\text{m}$  par jour) à la surface du tapis est compensée par la décomposition des restes microbiens en profondeur. La zone de croissance principale se situe dans la couche verte, où l'intensité



lumineuse est la plus forte, et où les filaments de *Chloroflexus* (garants de la structure du tapis) sont les plus actifs.

Le *sinter* (geyserite) présent sous le tapis ne joue pas de rôle dans la croissance ou la décomposition du tapis. Les deux éléments sont indépendants.

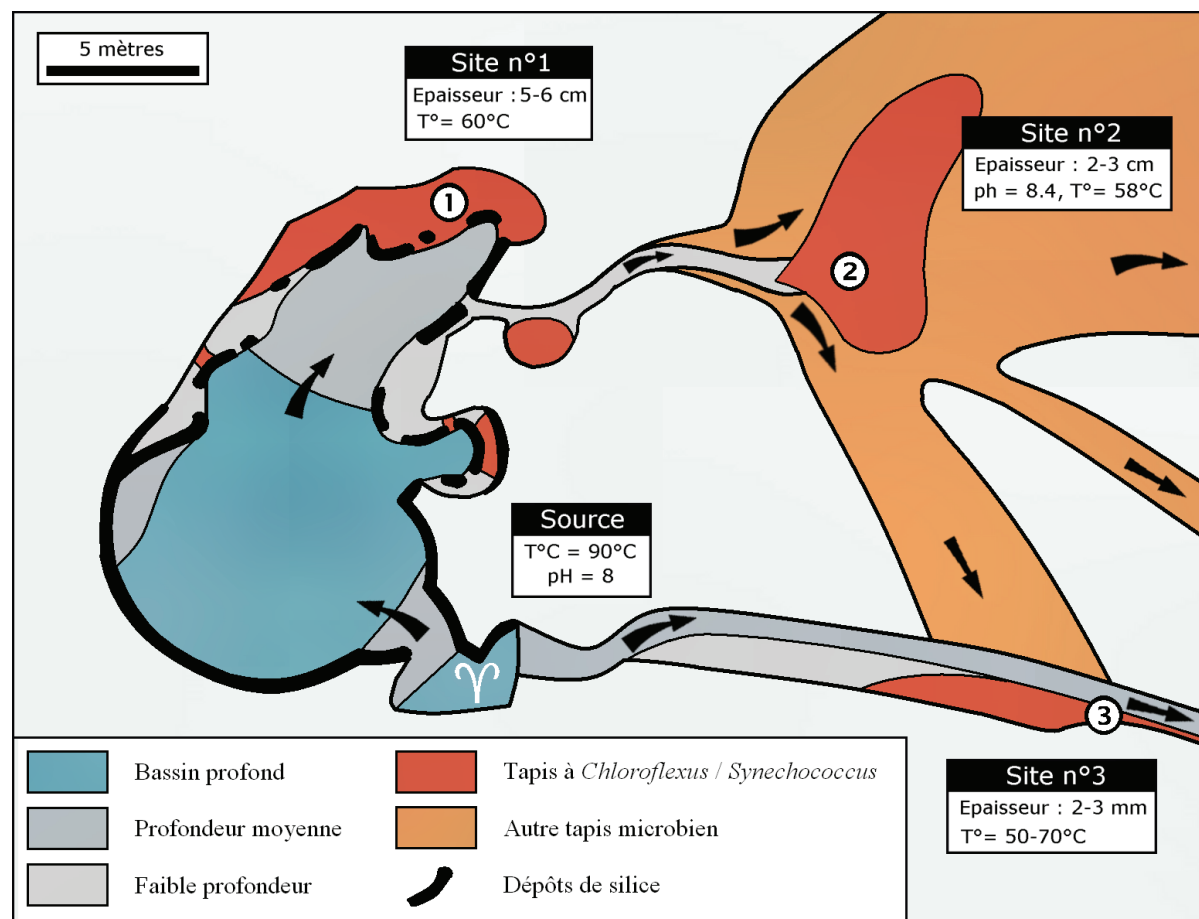


Fig. 2-4 : Représentation schématique d'Octopus Spring, avec les tapis microbiens visés, les relevés de température, et la localisation précise des sites de prélèvement.

### 2.1.3.2. Choix des points de prélèvements

Les tapis bactériens précédemment décrits ont été repérés en différents endroits de la source, de par leur couleur verte, laissant entrevoir du rouge au niveau d'hétérogénéités du tapis à cyanobactéries (*Synechococcus*). Des mesures de température ponctuelles au niveau de ces tapis (Fig. 2-4) nous ont confirmé qu'il s'agissait bien des tapis microbiens recherchés. Les sites choisis pour les prélèvements sont les suivants :

**Site n°1 :** Il s'agit d'un bassin secondaire, séparé du principal par une barrière discontinue de concrétions de silice. Le tapis microbien occupe toute la surface de ce bassin. Il n'y a pas plus d'un centimètre d'eau (qui est stagnante) à cet endroit. Le tapis présente une épaisseur de plusieurs centimètres, jusqu'au socle de silice (blanc)

**Site n°2 :** Ce site se trouve à la sortie du chenal partant du fond de la source, là où le flux d'eau s'épanche. Le tapis microbien est assez vaste, présentant différentes couleurs, correspondant à différentes souches microbiennes, en relation avec les variations de température. La vitesse d'écoulement de l'eau n'est pas très élevée, les tapis sont recouverts par 1 cm d'eau au maximum. L'épaisseur du tapis est de 1-2 cm. Les images prises lors de ces dernières décennies ont montré que ce tapis se situait auparavant plus en amont sur ce chenal (Fig. 2-3).

**Site n°3 :** Ce site se trouve sur le rebord du chenal qui part directement de la source. Dans ce chenal l'écoulement est important. De ce fait la température au milieu de l'écoulement est élevée. L'eau atteint cependant la température adéquate au développement des tapis à *Synechococcus* / *Chloroflexus* sur une longue zone large de quelques centimètres. Du fait de l'écoulement de l'eau et de l'étroitesse de l'endroit, le tapis microbien présent ici n'a pas plus d'un demi-centimètre d'épaisseur, et a une texture plus compacte qu'ailleurs.

### **2.1.3.3. Prélèvements**

Pour les sites n° 1 et 2, où l'épaisseur des tapis était conséquente, le prélèvement s'est fait en « carotant » le tapis sur toute sa profondeur à l'aide d'une seringue de 2 mL dont le bout a été découpé (cf. Fig. 2-5). Les masses humides prélevées sont approximativement de 1.5-2 g pour le site n°1 et de 1 g pour le site n°2. Pour le site n°3, la faible épaisseur du tapis microbien ne permettait pas un prélèvement par carottage. Des carrés de 2×2 cm (masse humide : environ 2 g) ont donc été découpés.

Une première caractérisation des échantillons prélevés a été faite par microscopie électronique au retour de la mission de terrain, pour mieux comprendre l'organisation des tapis et les formes microbiennes dominantes dans chacun des sites. Des frottis ont été réalisés à partir de petits morceaux de tapis, et observés entre lame et lamelle.



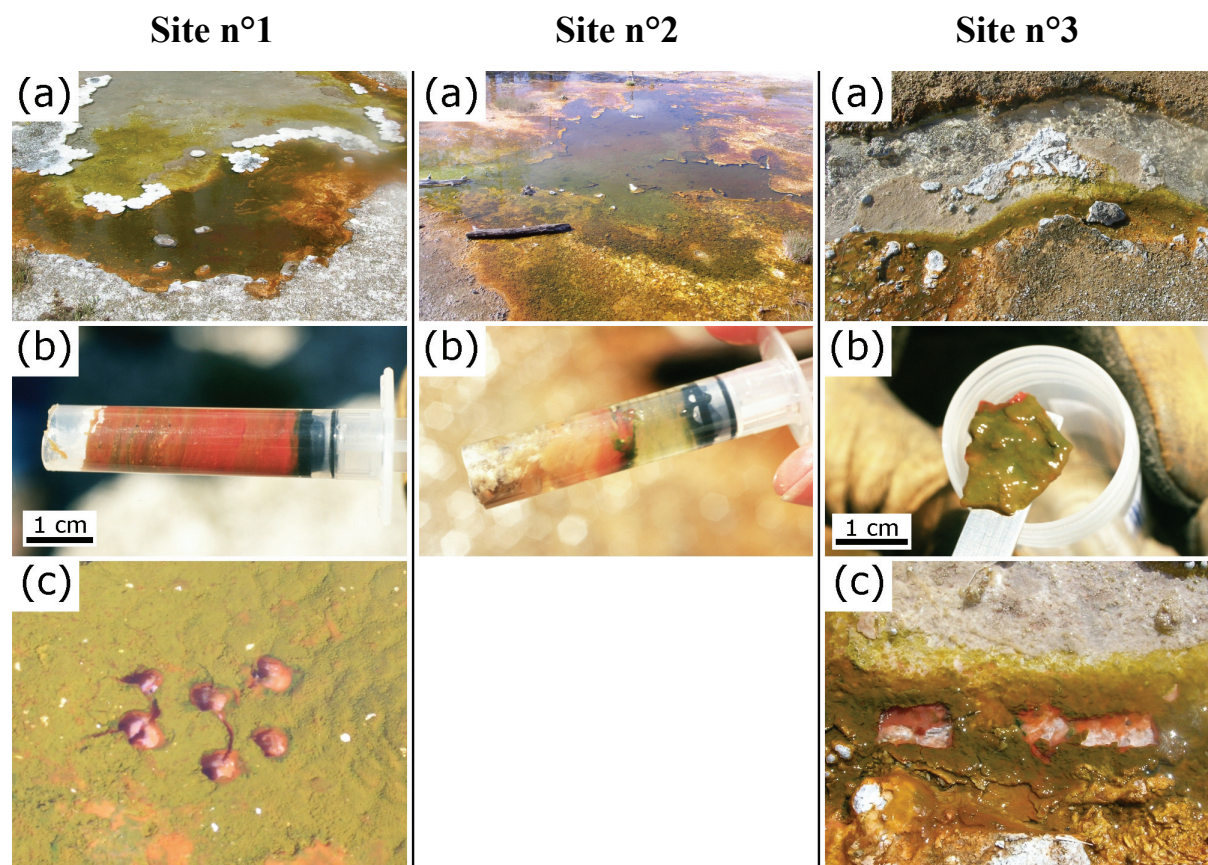


Fig. 2-5 : Prélèvement des tapis à *Chloroflexus* à Octopus Spring. Pour chaque site de prélèvement : (a) vue d'ensemble du tapis microbien, (b) morceau de tapis prélevé, et (c) traces laissées dans le tapis par le prélèvement.

## 2.2. Modes opératoires de la silicification expérimentale

### 2.2.1. Agent silicifiant

Pour qu'il y ait silicification, il faut que les micro-organismes soient dans un environnement saturé en silice. Ceci est simulé par l'injection d'une solution extrêmement concentrée de silice dans le milieu de culture, ou par le placement des cellules ou d'un tapis bactérien dans cette solution, diluée pour obtenir la concentration en silice souhaitée. Le phénomène de fossilisation en lui-même est obtenu en laissant ce mélange micro-organismes / silice à incuber en étuve pendant une durée prédéterminée.

Différents composés riches en silice ont été utilisés lors des précédentes fossilisations expérimentales, et à des concentrations diverses. Cela est allé d'un solvant organique (le

tétraéthylorthosilane, ou TEOS) (Oehler & Schopf, 1971, Oehler, 1976 ; Francis *et al.*, 1978 ; Westall *et al.*, 1995 ; Westall, 1997) à de la silice colloïdale (Ferris *et al.*, 1988) et, plus récemment, une solution de silicate de sodium (Birnbaum *et al.*, 1989 ; Toporski *et al.*, 2002 ; Yee *et al.*, 2003 ; Benning *et al.*, 2004a, 2004b ; Lalonde *et al.*, 2005). Par rapport au TEOS, cette solution de silicate de sodium permet de recréer plus fidèlement les conditions naturelles.

Dans la continuité des dernières fossilisations expérimentales, l'agent silicifiant choisi pour cette étude est une solution commerciale de silicate de sodium (Riedel de Haën), contenant approximativement ~27% de SiO<sub>2</sub> (silice) et ~10% de NaOH (Na<sub>2</sub>Si<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, M=242 g/mol).

### **2.2.2. Mise en contact des micro-organismes avec une solution saturée de silice**

#### ***2.2.2.1. Silicification expérimentale dans le milieu de culture à une concentration de 500 ppm de silice***

Avec ce mode opératoire, les micro-organismes ont été fossilisés dans le milieu de culture originel. Ainsi, les bactéries étaient encore vivantes lors de l'injection de la silice, et avaient des nutriments à disposition pour si possible rester vivantes encore un certain temps. Il est ainsi possible de voir comment la silice affecte la vie des cellules, jusqu'à leur mort, et comment cette mort se place dans la dynamique de la silicification. En procédant à la fossilisation expérimentale directement dans le milieu de culture, on peut également s'attendre à ce que la silice interagisse avec les éléments du milieu.

En raison de la forte concentration de la solution commerciale utilisée, et donc des faibles quantités nécessaires pour obtenir la concentration souhaitée, une solution de base a été préparée, en diluant dix fois 10 mL de cette solution dans de l'eau MilliQ. Dans des conditions stériles, cette solution a été filtrée à 0,2 µm pour stériliser et éliminer de possibles particules en suspension.

Pour chaque fossilisation expérimentale réalisée suivant ce protocole, un certain nombre de milieux de culture ont été préparés comme précédemment décrit (une dizaine pour

la fossilisation de *M. jannaschii*, 4-5 pour les autres souches, destinées à l'origine à être des fossilisation courtes). Tous les flacons sauf un étaient inoculés, ce dernier servant de témoin sans bactéries.

A la fin de la phase exponentielle de croissance (atteinte après des durées variables, suivant les souches, d'après contrôle au microscope à contraste de phase), 0,4 mL (ou 9 mL pour les cultures de 500 mL) de la solution de silice diluée 10 fois sont injectée par le septum dans tous les flacons, pour obtenir une concentration approximative en silice de 500 ppm. Les flacons sont ensuite placés dans une étuve à 60°C. La silice est également injectée dans le témoin sans bactéries. Cette injection de silice marque le temps zéro de la fossilisation expérimental, à partir duquel sont comptées les durées (24 heures, 1 mois, 1 an). Les injections de silice se font en conditions stériles, au voisinage d'un bec Bunzen. Seule une culture ne recevait pas d'injection de silice : ses bactéries immédiatement recueillies par filtration à 0,2 µm étaient fixées dans du glutaraldéhyde à 2,5 %, afin de servir d'échantillons témoin, pour observer les micro-organismes à l'état naturel.

La liste des échantillons de chaque souche préparés suivant ce mode opératoire, avec leur temps d'incubation respectifs est la suivante (l'incubation ayant été faite à 60°C, sauf mention contraire) :

- *M. jannaschii* :
  - Pour l'observation en microscopie électronique : 24 heures, 48 heures, 3 jours, 1 semaine, 2 semaines, 3 semaines, 1 mois, 2 mois, 1 an ;
  - Pour analyse de la matière organique : 24 heures, 1 semaine, 1 mois, 2 mois, 1 an.
- *P. abyssi* :
  - Pour l'observation en microscopie électronique : 24 heures, 1 mois, 4 mois, 9 mois, 1 an.
- *Geobacillus sp.* :
  - Pour l'observation en microscopie électronique : 24 heures, 1 mois, 10 mois.
- *Rhodovulum sp.* (incubation à 60°C) :
  - Pour l'observation en microscopie électronique : 24 heures, 1 mois, 9 mois.
- *Rhodovulum sp.* (incubation à T°C ambiante)
  - Pour l'observation en microscopie électronique : 24 heures, 1 mois, 9 mois.

Les tableaux du Chapitre III font le bilan des observations réalisées.

***Protocole utilisé pour la fossilisation expérimentale des tapis microbiens de Yellowstone***

Le protocole utilisé pour la fossilisation expérimentale des tapis microbiens prélevés à Octopus Spring est adapté de celui utilisé pour la fossilisation expérimentale des autres souches. Ces tapis ont été plongés dans une solution de silice à 500 ppm et la fossilisation expérimentale a été lancée immédiatement après le prélèvement.

Pour chaque site de prélèvement, ont été préparés les échantillons suivants :

- 3 prélèvements de tapis fossilisés expérimentalement : à partir de la solution commerciale de silicate de sodium identique à celle utilisée pour les autres fossilisations expérimentales, une solution diluée 10 fois a été préparée en préalable. Après le prélèvement (par carottage ou découpe du tapis), les morceaux de tapis ont été placés dans des flacons en plastique, puis recouverts de 20 mL d'eau distillée auxquels ont été ajoutés environ 0,4 mL de la solution diluée, pour obtenir une concentration en silice finale d'approximativement 500 ppm. Le flacon était ensuite refermé.
- Un prélèvement de tapis a été immédiatement fixé dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5%.
- Enfin, un dernier prélèvement était conservé dans 20 mL d'eau de la source.

L'injection de la silice dans les flacons marque le temps zéro de la fossilisation expérimentales. Les durées de fossilisation de chaque échantillon n'ont été fixées qu'a posteriori. Au final, les trois échantillons fossilisés ont respectivement été prélevés après 15 jours, 5 mois et 1 an.

La silicification ayant été lancée sur le terrain, il n'était pas possible de la faire débiter à une température de 60°C comme dans le cas des fossilisations expérimentales initiées en laboratoire. En tenant compte du rapatriement des échantillons en France, les premiers jours de fossilisation expérimentale se sont déroulés à température ambiante. Considérant le fait que les premiers instants de la fossilisation sont les plus importants, et dans le souci de ne pas créer un artefact, nous avons décidé de ne pas placer les échantillons en cours de fossilisation en étuve à 60°C au retour de la mission de terrain, et de laisser cette simulation se dérouler à température ambiante.

Ainsi dans ce cas, contrairement aux fossilisations expérimentales effectuées en laboratoire, il n'a pas été possible de se placer dans des conditions expérimentales simulant un environnement naturel de la Terre primitive.

#### **2.2.2.2. Variations du mode opératoire**

La fossilisation des micro-organismes selon les modes opératoires décrits ici a été entreprise après le constat de l'absence de fossilisation des cellules de *M. jannaschii*, en présence de 500 ppm de silice dans leur milieu de culture. L'objectif premier était de savoir si cette absence de fossilisation était due au mode opératoire utilisé.

Nous avons ainsi voulu tester le mode opératoire de Toporski *et al.* (2002) qui avait été validé par la silicification des Bactéries *Desulfovibrio indonensis* et *Pseudomonas fluorescens*, dans une solution de silicate de sodium pure à une concentration de 5000 ppm.

Enfin, en fossilisant les micro-organismes dans leur milieu de culture à une concentration en silice de 5000 ppm, nous voulions voir si l'augmentation de la quantité de silice, bien au-delà des concentrations naturelles, pouvait effectivement permettre la fossilisation. En cas de réussite, cela nous orienterait vers un problème dans le protocole utilisé à l'origine ; en revanche une nouvelle non-fossilisation viendrait conforter l'hypothèse que *M. jannaschii* ne peut pas être fossilisée. Certains des autres micro-organismes utilisés lors de cette étude ont également été silicifiés selon ces différents modes opératoires.

#### ***Fossilisation dans une solution de silice pure***

Selon les conditions expérimentales de Toporski *et al.* (2002), nous avons préparé une solution de base de silicate de sodium à 5000 ppm (ce qui représente 17,9 mL de la solution commerciale diluée dans 1 L d'eau distillée). Le pH a ensuite été ajusté à 8 avec de l'HCl 5N (le pH avant ajustement était de 10,8). Enfin, la solution est filtrée avant utilisation pour éliminer les particules.

Comme pour le mode expérimental précédent, 4 milieux de culture sont préparés pour chaque souche, dont 3 seulement sont inoculés, le dernier servant de témoin sans bactéries.

A la fin de la phase exponentielle de croissance, les bactéries sont récupérées par filtration sur un filtre Millipore 0,2 µm. La quantité de culture filtrée à chaque fois dépendait

de la vitesse à laquelle le filtre se bouchait, et donc de la densité cellulaire dans la culture : 10 mL pouvaient être filtrés pour *M. jannaschii*, alors qu'il n'était pas possible d'en filtrer plus de 2 pour *P. abyssi*. Après filtration des bactéries, les micro-organismes sont rincés en faisant passer à travers le filtre une quantité d'eau distillée au moins équivalente au volume filtré.

Ces filtres étaient ensuite placés dans des flacons en plastique, et recouvert d'environ 10 mL de la solution de silice à 5000 ppm, à pH 8, puis mis en étuve à 60°C, le temps que la fossilisation se fasse.

Voici la liste des échantillons préparés suivant ce mode opératoire pour chacune des souches, avec leurs temps d'incubation respectifs, l'incubation ayant faite à 60°C :

- *M. jannaschii* :
  - Pour l'observation en microscopie électronique : 48 heures, 2 mois.
- *P. abyssi* :
  - Pour l'observation en microscopie électronique : 24 heures, 1 mois.
- Rhodovulum :
  - Pour l'observation en microscopie électronique : 24 heures, 1 mois.

Les tableaux du Chapitre III font le bilan des observations réalisées.

### ***Fossilisation expérimentale dans le milieu de culture à une concentration en silice de 5000 ppm***

Le mode opératoire est identique à celui utilisé pour la fossilisation à une concentration à 500 ppm (cf. paragraphe 2.2.2.1.), à l'exception de la quantité de silice injectée.

3,6 mL de la solution de silicate de sodium préalablement diluée 10 fois a été injectée dans les flacons. L'injection marque le temps zéro de la silicification. Aucun témoin sans micro-organismes n'a été préparé pour ce mode opératoire.

Voici la liste des échantillons préparés suivant ce mode opératoire pour chacune des souches, avec leur temps d'incubation, l'incubation ayant été faite à 60°C :

- *M. jannaschii* :
  - Pour l'observation en microscopie électronique : 48 heures, 2 mois

- *P. abyssi* :
  - Pour l'observation en microscopie électronique : 24 heures, 1 mois.

Les tableaux du Chapitre III font le bilan des observations réalisées.

### **2.2.3. Incubation**

Afin d'être proche des températures supposées de l'Archéen inférieur, les échantillons ont été placés dans une étuve à 60°C, sans agitation, pendant toute la durée de la fossilisation, et ce quelque soit le mode opératoire utilisé.

### **2.2.4. Prélèvement et fin de la fossilisation**

#### ***2.2.4.1. Dans le cas d'une fossilisation dans le milieu de culture originel***

A la fin du temps de fossilisation prévu, les échantillons sont prélevés en filtrant une certaine quantité du milieu (contenant silice et bactéries) sur un filtre Millipore 0,2 µm. Le filtre est ensuite plongé dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % pour fixer les microorganismes et ainsi stopper le processus de fossilisation expérimentale. La solution récupérée au sortir du filtre (mélange de silice et de milieu de culture) est gardée, et son pH est mesuré. Les échantillons sont ensuite conservés à 4°C jusqu'à la préparation pour la microscopie électronique. Pour chaque échantillon, deux prélèvements ont été faits.

Pour chaque prélèvement, la quantité filtrée dépend de la vitesse à laquelle le filtre se bouche, et donc essentiellement de la densité cellulaire. Ainsi dans le cas de *M. jannaschii*, avec une densité cellulaire assez faible, il était possible de filtrer une dizaine de millilitres à chaque fois, une culture de 20 mL étant consommée avec deux prélèvements. En revanche, *P. abyssi* présentant une densité cellulaire très forte, un prélèvement se limitait à 2 mL environ. Il restait donc une grande partie de la culture après chaque prélèvement. Celle-ci était remise en étuve pour que la fossilisation se poursuive. Cela a permis de prolonger significativement la durée de la simulation (1 an, contre 1 mois initialement prévu).

#### **2.2.4.2 Cas de la fossilisation dans une solution de silice pure**

A la fin, de la fossilisation, les filtres sont simplement retirés de la solution de silice et plongés dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% pour fixer les micro-organismes. La solution de silice est gardée et son pH est mesuré.

#### **2.2.4.3. Cas des tapis microbiens prélevés à Octopus Spring**

Les prélèvements des trois échantillons fossilisés de chacun des trois sites, sont respectivement été effectués après 15 jours, 5 mois et 1 an de fossilisation expérimentale à température ambiante. A la fin de ces durées, les tapis ont été sortis de la solution de silice, fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5%, et conservés à 4°C jusqu'à la préparation pour la microscopie électronique. La solution de silice restante a été filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$ , conservée, et son pH mesuré.

#### **2.2.4.4. Lyophilisation pour les analyses chimiques**

Les échantillons destinés aux analyses de la matière organique ont quant à eux été lyophilisés à la fin de la fossilisation expérimentale. Les cultures de 500 mL sont centrifugées (7000 g, 20 minutes) pour concentrer les cellules. Le surnageant est ensuite évacué, en ne gardant que 50-100 mL de liquide pour la lyophilisation. Le tout est congelé à -80°C.

Seul l'échantillon ayant été fossilisé pendant un an a été traité de façon légèrement différente. Après un an en étuve, le précipité de silice observé habituellement avait décanté et formé un dépôt consistant au fond du flacon. Ce dépôt a été lyophilisé comme à l'habitude. Le surnageant a également été lyophilisé, afin de déterminer si de la matière organique y était encore présente.



## **2.3 Microscopie électronique**

Si la microscopie optique était utile pour le contrôle de la croissance des microorganismes, elle ne possède pas une résolution suffisante pour constater l'état morphologique de cellules d'un micron de diamètre. De plus si le précipité de silice est visible en microscopie optique, il est nécessaire d'avoir une résolution plus grande afin d'observer le détail des grains de silice nanométriques, et les interactions entre cette silice et les microorganismes.

Les Microscopies Electroniques à Balayage et en Transmission (MEB et MET) permettent d'atteindre ces résolutions, et fournissent chacune des informations complémentaires sur le processus de fossilisation.

### **2.3.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)**

#### ***2.3.1.1. Principes, particularités, apports spécifiques***

##### ***Principe du microscope***

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique d'imagerie basée sur les interactions électrons / matière. Un faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon étudié, qui émet certaines particules en retour. Ces dernières sont collectées par un détecteur, qui permet alors de reconstruire une image de la surface.

Les électrons sont produits par un canon à électrons (thermoïonique ou à effet de champ), et le faisceau est focalisé grâce à des lentilles électromagnétiques qui jouent le même rôle que des lentilles de verres en microscopie optique. Le balayage est assuré par une série de bobines montées, comme les lentilles électromagnétiques, dans la colonne du microscope. Le vide est maintenu dans l'enceinte de l'instrument.

L'interaction entre les électrons primaires et l'échantillon, monté sur une platine porte-objet mobile, génère des particules telles que les électrons secondaires et des électrons rétro-diffusés, ainsi que des rayons X utilisés lors des analyses EDX (*Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*), grâce à des détecteurs spécialisés. A chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique, dont l'intensité dépend à chaque fois de la nature de l'échantillon et de sa topographie.

### ***Précautions pour la préparation des échantillons***

En préalable à l'observation au MEB, les échantillons doivent être déshydratés puis séchés. Cette procédure évite d'insérer un échantillon humide dans l'enceinte du microscope, où le vide est fait et où l'évaporation du liquide pourrait causer des dommages à l'échantillon. Les techniques de déshydratation sont utilisées afin d'éviter les effets destructeurs des forces de tension qui se produisent à l'interface eau / air qui pourraient avoir lieu en cas de séchage à l'air (Fratesi *et al.*, 2004). La déshydratation et le séchage peuvent toutefois entraîner une distorsion des échantillons.

Il convient donc lorsque l'on observe au MEB de savoir identifier les artefacts qui peuvent être induits par la méthode de préparation. Par exemple, chaque technique de préparation des échantillons pour le MEB révèle un aspect différent des biofilms. L'aspect naturel est ainsi mieux reporté en Cryo-MEB, tandis que le séchage par la méthode du point critique (CPD), en éliminant la couche d'EPS superficielle, permet une observation en profondeur de l'échantillon, se focalisant davantage sur les cellules. L'élimination de cette couche superficielle permet également de mettre en évidence les détails et la structure fibreuse des EPS. Le point critique induit quelques déformations de l'échantillon. Du fait du séchage, celui-ci se contracte. Sur un tapis bactérien, cela entraîne un rapprochement des bactéries, donnant l'impression d'une densité cellulaire supérieure à la réalité. Sur un échantillon tel qu'un précipité de silice, cela peut provoquer des fractures qui permettent l'observation de l'intérieur de cette structure. Dans les résultats présentés pour cette étude, c'est la préparation des échantillons par la méthode du point critique a été principalement utilisée.

#### ***2.3.1.2. Préparation des échantillons***

##### ***Préparation des échantillons par la méthode du point critique***

L'échantillon conservé dans une solution de glutaraldéhyde est préalablement resuspendu par agitation. Entre 0,5 mL et 1 mL cette solution est ensuite prélevé à la seringue, avec le plus de matière en suspension possible.

Les échantillons sont ensuite rincés quatre fois pendant 15 minutes dans un tampon de phosphate de sodium à pH = 7,4, avec une légère agitation. A la fin des rinçages, les échantillons sont récupérés par filtration sur filtre Millipore à 0,2 µm et placés dans des

capsules en céramique poreuse, utilisées spécialement pour le séchage par la méthode du point critique. Ils sont ensuite déshydratés par une série de mélanges éthanol / eau distillée, aux pourcentages croissants de 10, 30, 50, 70, 93 % et finalement trois fois dans l'éthanol absolu (15 minutes pour chaque bain). Ceci est suivi par une série de mélanges éthanol / acétone aux proportions croissantes (10, 30, 50, 70, 90 et finalement trois fois dans de l'acétone à 100 %, toujours 15 minutes pour chaque étape). Les échantillons ont ensuite été séchés par la méthode du point critique : dans une enceinte pressurisée, l'acétone est progressivement remplacée par du CO<sub>2</sub> liquide. En chauffant l'enceinte, on atteint le point critique du CO<sub>2</sub> (31°C, 73,8 bars), où celui-ci passe instantanément de l'état liquide à l'état gazeux, sans endommager l'échantillon. L'appareil utilisé est un CPD-030 de chez Baltec.

L'objectif au moment de la filtration n'était pas d'obtenir une grande quantité de matériel filtré, formant une épaisseur sur le filtre. En effet dans ce cas, le point critique faisait se décoller ce dépôt, ne laissant plus rien sur le filtre. En se limitant à un dépôt raisonnable (quelques mL filtrés), on s'assure de la qualité de l'échantillon observé.

A l'issue du séchage, les échantillons (matérialisé sous la forme de morceau de filtre Millipore portant l'échantillon sensu stricto) sont ensuite collés avec de la laque d'argent sur des supports en aluminium. Enfin, les échantillons sont métallisés à l'or avant d'être observés et analysés avec le Microscope Electronique à Balayage à Emission de Champ (MEBEC) Hitachi S4500 du Centre de Microscopie Electronique de l'Université d'Orléans, équipé avec un détecteur EDX (Oxford Instruments).

### ***Préparation pour le Cryo-MEB***

La préparation pour le Cryo-MEB consiste en une congélation rapide de l'échantillon, puis en une sublimation de la glace. Du fait de la rapidité du refroidissement, les cristaux de glace formés ne dépassent pas quelques nanomètres, en deçà de la résolution du microscope. Cette préparation est donc particulièrement adaptée pour les échantillons biologiques riches en eau, comme les tapis microbiens (Défarge, 1997). S'il permet une préparation plus respectueuse des structures organiques, le Cryo-MEB ne permet toutefois pas d'atteindre la résolution offerte par le MEBEC. La cryo-préparation a été utilisée, pour l'instant, uniquement pour l'observation du tapis microbien à *Chloroflexus* prélevé à Octopus Spring, au niveau du site n°3.

Après un rinçage dans un tampon de phosphate de sodium, le morceau de tapis bactérien est placé sur un support puis plongé dans le l'azote pâteux à -210°C. Le tapis congelé a ensuite été découpé pour permettre d'observer une section. La sublimation de la couche de glace superficielle, en remontant la température vers -90°C, dévoile les structures du tapis. L'observation ne nécessite pas de métallisation.

### **2.3.2. Microscopie Electronique en Transmission**

#### **2.3.2.1. Principes, particularités, apports spécifiques**

Comme pour le MEB, le microscope électronique en transmission (MET) utilise un faisceau d'électron pour observer un échantillon, cette fois extrêmement mince. Les électrons, produits et focalisés de la même manière que pour le MEB, traversent l'échantillon, au lieu d'être réfléchis, avant d'être collectés par les détecteurs. Les électrons qui traversent l'échantillon sont plus ou moins absorbés selon l'épaisseur, la densité ou la nature chimique de ce dernier. Le détecteur renvoie donc une image par transparence de l'échantillon.

#### **2.3.2.2. Préparation des échantillons**

Pour l'observation et l'analyse au MET, les échantillons (les microorganismes fossilisés) sont inclus dans un bloc de résine dont on fait ensuite des coupes ultrafines. Le défi principal de cette préparation était de concentrer les cellules et de connaître leur localisation dans les blocs de résine, afin de se donner le plus de chances possible d'obtenir des coupes des micro-organismes fossilisés (dont la taille ne dépasse pas 1 µm).

Dans certains protocoles, le tétr oxyde d'osmium (OsO<sub>4</sub>), a été utilisé pour une post-fixation et comme colorant. Toporski *et al.* (2002) ne l'ont pas utilisé pour l'observation de leurs micro-organismes fossilisés, de même que les autres colorants habituels (acétate d'uranyle, citrate de plomb), afin que ces substances n'entraînent pas d'accentuation de contraste sur les sections ultra-fines, ni de précipités de grains minéraux, et ce, afin de pouvoir mieux mettre en évidence la présence de silice sur et autour des structures cellulaires. Les cristaux de silice sont en effet très opaques au faisceau d'électron, et la silice amène d'elle-

même une augmentation de contraste lorsqu'elle se fixe sur les structures cellulaires (à la manière d'un colorant).

L'échantillon conservé dans une solution de glutaraldéhyde est préalablement resuspendu par agitation. Entre 1 mL et 2 mL cette solution sont ensuite prélevés, avec le plus de matière en suspension possible. Les échantillons sont ensuite rincés quatre fois pendant 15 minutes dans un tampon de phosphate de sodium à pH = 7,4, avec une légère agitation. Après ce rinçage, les échantillons sont filtrés sur un filtre Millipore à 0,2  $\mu$ m qui est ensuite coupé en petits carrés d'un millimètre de côté environ, puis recouvert d'une solution d'agar-agar à 20 g/L. Après que l'agar-agar ait refroidi et durci, l'échantillon a été deshydraté par une série de mélanges éthanol / eau distillée, aux pourcentages croissants de 10, 30, 50, 70, 93 % et finalement trois fois dans l'éthanol absolu (15 minutes pour chaque bain). Ceci est suivi par une série de mélanges éthanol / acétone aux proportions croissantes (10, 30, 50, 70, 90 et finalement trois fois dans de l'acétone à 100 %, toujours 15 minutes pour chaque étape). Les échantillons ont été placés dans de la résine TAAB 812 (TAAB Laboratories, Royaume-Uni), par une série de mélanges acétone / résine aux proportions croissantes : 3:1, 1:1, 1:3, puis deux bains dans la résine pure ; 3 heures pour chaque étape. Les blocs de résines ont été laissés à durcir dans un four à 60°C pendant trois jours. Les coupes ultrafines ont été obtenues en utilisant un couteau de diamant Diatome sur un ultramicrotome Reichert, puis placées sur des grilles de MET en cuivre (300 mailles, Electron Microscopy Sciences), préalablement traitées avec du carbone (afin d'améliorer la tenue des coupes sur les grilles).

L'utilisation du filtre Millipore comme support des cellules est destinée à faciliter le repérage de l'échantillon au milieu du bloc de résine tout au long de la préparation. En effet, les masses de bactéries et de silice mêlées sont invisibles à l'œil nu, ou à la loupe binoculaire, ce qui rendrait la découpe fortement aléatoire. Lors de la découpe du bloc de résine à l'ultramicrotome, on repère les zones intéressantes par la présence du filtre (aisément repérable) sur les coupes. Lors de l'observation des coupes au MET, le filtre représente un point de repère qui se retrouve facilement. Il épargne ainsi une longue recherche des micro-organismes : les zones où ils sont sensés se trouver se localisent à proximité immédiate du filtre.

### **Coloration des sections ultrafines**

Certaines des coupes ont été « colorées » afin de mieux mettre en évidence les structures organiques. Les deux « colorants » utilisés se fixent sélectivement sur les molécules organiques. Ils contiennent des éléments lourds (plomb et uranium) qui font écran au faisceau d'électron et augmentent ainsi le contraste. Les échantillons ont également été observés sans coloration afin de mieux mettre en évidence la précipitation de silice.

Les colorants utilisés sont le citrate de plomb (0,04g de  $C_{12}H_{10}O_{14}Pb_3 \cdot 3H_2O$  dissous dans 10 mL d'eau distillée préalablement bouillie. Ajout de 1 mL de NaOH à 1N) et l'acétate d'uranyle (0,666 g de  $UO_2(CH_3COO) \cdot 2H_2O$  dans 10 mL d'éthanol à 50%). Les solutions ont été filtrées à 0,2  $\mu m$  avant utilisation.

Pour le citrate de plomb, dans une boîte de Pétri contenant un tissu imbibé d'eau distillée et recouvert de pastilles de NaOH, on place un morceau de parafilm sur lequel on dépose une goutte de la solution de citrate de plomb. La grille est posée sur la goutte (la face avec la coupe au contact du colorant) pendant 7 minutes, puis est rincée en plaçant successivement la grille sur des gouttes d'une solution de NaOH à 1N et d'eau distillée. Pour l'acétate d'uranyle, dans une boîte de Pétri contenant un tissu imbibé d'éthanol, on place un morceau de parafilm sur lequel on place une goutte de la solution d'acétate d'uranyle. La grille est posée sur la goutte pendant 20 minutes à l'abri de la lumière, puis rincée en plaçant la grille sur une succession de gouttes d'éthanol et d'eau distillée. La grille est finalement séchée.

Les observations et analyses ont été faites sur un MET Philips CM20 équipé d'un détecteur EDX (Oxford Instruments)

## **2.4. Adsorption et fixation d'ions métalliques par *M. jannaschii***

Différentes études ont montré qu'une fixation de fer sur les parois de Bactéries peut favoriser la fixation de silice (Ferris *et al.*, 1988 ; Fein *et al.*, 2002). Cela se fait d'une part par l'inhibition des enzymes autolytiques, responsables de la dégradation des cellules après leur mort, laissant ainsi plus de temps à la silice pour se fixer et préserver les structures (Ferris *et al.*, 1988). D'autre part, quand la paroi des micro-organismes est chargée négativement, les

cations métalliques peuvent servir d'intermédiaire entre des groupes fonctionnels chargés négativement, et les polymères de silice, eux aussi chargés négativement (Fein *et al.*, 2002).

Les résultats de la fossilisation de *M. jannaschii* ayant montré une absence de fossilisation et une lyse des cellules, cette étude était donc destinée à vérifier tout d'abord que la paroi d'une Archée peut fixer des cations métalliques en solution, puis ensuite voir si la présence de fer pouvait avoir une influence, ou non, sur le déroulement de la fossilisation et la préservation des cellules. Le mode opératoire utilisé est adapté de ceux utilisés par Beveridge & Murray (1976) et Beveridge & Koval (1981) pour montrer l'adsorption de cations métalliques par les Bactéries.

#### **2.4.1. Culture des micro-organismes, et fixation des ions métalliques**

Des cultures de 20 mL de *M. jannaschii* ont été obtenues en suivant le mode opératoire décrit dans le paragraphe 2.1.2.1. En parallèle, des solutions de cations métalliques à 10 mM ont été préparées pour le fer (ion  $\text{Fe}^{3+}$  : par dissolution de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dans de l'eau distillée), le cuivre (ion  $\text{Cu}^{2+}$  :  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), le zinc (ion  $\text{Zn}^{2+}$  :  $\text{ZnCl}_2$ ), le plomb (ion  $\text{Pb}^{2+}$  :  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ), le calcium (ion  $\text{Ca}^{2+}$  :  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

A la fin de la phase exponentielle de croissance, 10 mL de culture ont été filtrés sur filtre Millipore 0,2  $\mu\text{m}$ , et rincés avec de l'eau distillée. Le filtre (supportant les cellules) est ensuite placé dans un flacon en plastique et est recouvert de 10 mL de solution d'ion métallique à 10 mM (préalablement filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$  pour la stériliser et éliminer les grosses particules en suspension). Les micro-organismes ont été laissés à incuber dans cette solution dans une étuve à 60°C pendant une heure.

Au final, le filtre est récupéré, rincé à nouveau à l'eau distillée, et est placé dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% pour fixer les micro-organismes. Le tout est conservé à 4°C jusqu'à utilisation. La solution d'ions métalliques restante est filtrée et conservée ; son pH est mesuré.

Pour chaque métal testé, un filtre Millipore vierge a également été mis à incuber dans les solutions, pour servir de témoins sans bactéries.

### **2.4.2. Analyse par spectrométrie à absorption atomique**

La concentration en ions métalliques des solutions a été mesurée par spectrométrie par absorption atomique. Cette technique est basée sur le fait que les atomes libres peuvent absorber la lumière d'une longueur d'onde spécifique. L'échantillon à analyser est en solution. Il est ensuite aspiré par un tube capillaire et envoyé dans une flamme. Là, sous l'effet de la chaleur, le liquide est évaporé et les sels métalliques sont vaporisés, fondus, et séparés en atomes. Un faisceau de lumière traverse la flamme et atteint un détecteur qui en mesure l'absorbance. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre par absorption atomique GBC 905AA.

La mesure de concentration s'est faite par la méthode des ajouts dosés. Ainsi dans le cas de la mesure de l'ion  $\text{Fe}^{3+}$ , 100  $\mu\text{L}$  de la solution recueillie après une heure d'incubation des bactéries est prélevée et diluée 100 fois dans 10 mL d'eau distillée. Une goutte d'acide ( $\text{HNO}_3$  à 2N) est ajoutée. L'échantillon est ensuite fractionné en quatre parts de 2,5 mL. Dans chaque flacon, on ajoute respectivement 0, 5, 10 et 15  $\mu\text{L}$  d'une solution standard de  $\text{Fe}^{3+}$ , d'une concentration de 1000 ppm, pour augmenter la concentration de l'ion de 0, 2, 4 et 6 ppm respectivement. Les quatre solutions sont ensuite analysées.

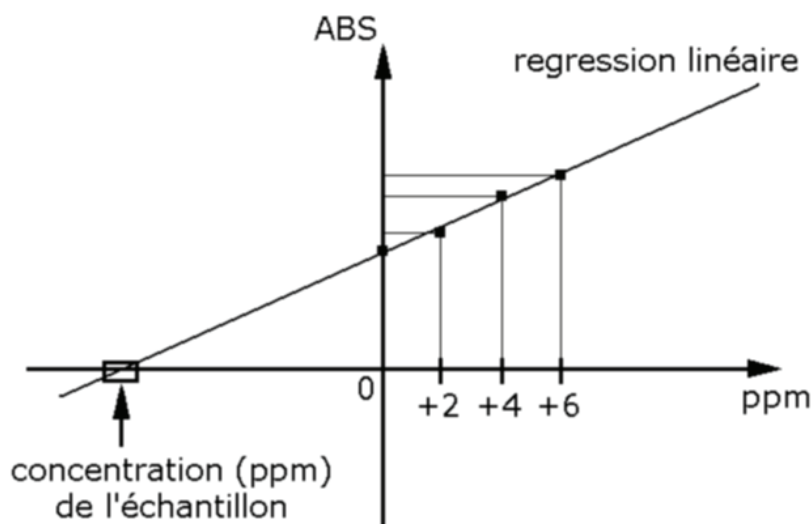


Fig. 2-6 : Obtention de la concentration de l'échantillon mesurée par régression linéaire.

Les mesures d'absorbance de la série d'échantillons permettent d'établir une régression linéaire (Fig. 2-6), relation entre l'absorbance et la concentration en ion métallique (exprimée en ppm) :

$$Abs = a.[Me] + b \quad (1)$$



Le point d'abscisse où la droite de la régression linéaire coupe l'abscisse nous donne la valeur (en ppm) de la concentration dans l'échantillon d'origine. On obtient les coordonnées de ce point et la valeur de cette concentration, en calculant la valeur de  $[Me]$  pour laquelle  $Abs = 0$  :

$$[Me] = b/a \quad (2)$$

Cette régression linéaire permet également de calculer la concentration des autres échantillons de la série (duplicats, ou témoins sans bactéries dans notre cas), en résolvant l'équation :

$$0 = a.[Me] + Abs(nouvel \text{ échantillon}) \quad (3)$$

Ce mode opératoire a été identiquement utilisé pour la mesure des concentrations des ions  $Pb^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Cu^{2+}$ .

#### **2.4.3. Microscopie Electronique en Transmission**

Pour les observations au MET, des blocs de résines ont été préparés de la manière décrite au paragraphe 2.3.2.2.

Les cellules de *M. jannaschii* ont été récupérées dans le glutaraldéhyde par centrifugation. Contrairement aux préparations des fossilisations expérimentales, où seulement 1 ou 2 mL de glutaraldéhyde étaient récupérés, avec des cellules en suspension, l'intégralité de l'échantillon a ici été utilisée, pour s'assurer de la présence du maximum de matériel microbien possible. Malgré cette précaution, les culots obtenus en fin de centrifugation n'étaient pas très importants.

La suite de la préparation a été identique à celle qui a été précédemment exposée : rinçages au tampon de phosphate de sodium, filtration, agar, déshydratation (éthanol puis acétone). Pour chaque échantillon, un seul bloc de résine a été préparé, là encore dans un souci de concentrer au maximum les cellules.

L'objectif étant de mettre en évidence une éventuelle fixation d'ions métalliques sur la paroi cellulaire par un contraste accentué au MET, aucune coloration n'a été d'abord été

réalisée lors de cette préparation (pas d'utilisation de tétraoxyde d'osmium lors de la préparation des blocs, pas de coloration des coupes à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb). Toutefois, dans certains cas, la coloration au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyle a été faite sur des coupes déjà observées afin de chercher confirmer la nature cellulaire des structures observées. La méthode de coloration mise en œuvre est celle décrite paragraphe 2.3.2.2.

#### **2.4.4. Fixation de fer suivie d'une silicification**

Pour tester si une fixation préalable de fer pouvait permettre la fossilisation de *M. jannaschii*, des cultures ont été silicifiées après avoir été exposée à une solution de Fer (III).

Des cultures de 20 mL ont été obtenues de la même façon que décrit précédemment (cf. paragraphe 2.1.2.1.). A la fin de la croissance, 1 mL d'une solution de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  à 210 mM, préalablement filtrée et stérilisée, a été injecté dans les flacons afin d'obtenir une concentration finale de 10 mM. Les cultures ont été laissées à incuber dans une étuve à 60°C pendant une heure. 0,4 mL de la solution de silice diluée 10 fois ont ensuite été injecté par le septum pour obtenir une concentration approximative en silice de 500 ppm. Les flacons ont ensuite été placés dans une étuve à 60°C pendant 2 mois.

Le prélèvement des échantillons, la fixation dans le glutaraldéhyde, ainsi que la préparation pour le MEB sont en tout point identique à ce qui été décrit précédemment (paragraphe 2.2.4.1. et 2.3.1.2.).

### **2.5. Analyse de la matière organique durant la fossilisation de *M. jannaschii***

Les différentes catégories de molécules organiques ont principalement été analysées sur des lyophilisats préparés à partir de cultures de *M. jannaschii* fossilisées pendant des durées diverses (de 24 heures à 1 an), et d'une culture non fossilisée.

En complément, une extraction des EPS et des cellules a été réalisée sur une culture non fossilisée, afin de pouvoir identifier d'éventuels composés spécifiques, et de pouvoir ainsi suivre leur comportement au cours de la fossilisation expérimentale.

### **2.5.1. Séparation des EPS et des cellules**

Une culture de *M. jannaschii* de 500 mL est centrifugée pendant deux heures à 20000 g, afin de séparer les corps cellulaires. A la fin de la centrifugation, on obtient un culot de cellules au fond des flacons, recouvert d'un culot d'EPS (EPS non dissous). Le reste des EPS, qui est dissous dans le surnageant, est ensuite précipité et récupéré. 20g/L de NaCl sont ajoutés au surnageant. Les EPS sont ensuite précipités à froid en ajoutant un volume d'éthanol absolu pour un volume de culture. Les échantillons sont gardés au froid le temps de la précipitation et de la décantation. Les EPS sont enfin récupérés par centrifugation (5000 g) et rincés dans une série de bains successifs à l'éthanol (70 %, 75 %, jusqu'à 100 %). La même procédure de rinçage est appliquée au culot cellulaire.

Les EPS recueillis et les cellules ont été conservés dans l'éthanol absolu à 4°C jusqu'au moment des analyses.

### **2.5.2. Analyse des acides aminés**

La composition en acides aminés des échantillons issus de la fossilisation expérimentale a été déterminée par hydrolyse acide, et dérivation au phénylisocyanate (PITC), avant analyse par HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Pression).

#### ***2.5.2.1. Echantillons préparés***

Dans le tableau ci-après sont compilées les masses de lyophilisat de chaque échantillon, utilisées pour l'analyse des acides aminés :

**Tableau 2-I : Masses de lyophilisat (ou d'échantillons sec pour les cellules et les EPS) utilisées pour l'analyse des acides aminés.**

<b>Echantillon</b>	<b>Masse (mg)</b>
<i>Etat naturel</i>	32,5
<i>Cellules</i>	~2,1
<i>EPS</i>	~2
<i>24 heures</i>	26,9
<i>1 semaine</i>	16,9
<i>1 mois</i>	57,8
<i>2 mois</i>	19,1
<i>1 an</i>	35,6
<i>1 an (surnageant)</i>	32,3

Pour les échantillons conservés dans l'éthanol absolu, 400 µL ont été prélevés pour les cellules, et 1 mL pour les EPS, puis l'éthanol a été évaporé sur une plaque chauffante à 30°C sous un flux d'azote. Pour ces deux échantillons, les masses sèches calculées sont infimes et approximatives, et sont donc à considérer avec précaution.

Les échantillons ont été analysés en deux fois, avec un intervalle de plusieurs mois entre les deux séries :

- Première série : 24 heures, 1 semaine, 1 mois, 2 mois de fossilisation ; EPS
- Seconde série : Etat naturel, 1 mois et 1 an ; Cellules.

L'échantillon correspondant à 1 mois de fossilisation a été analysé lors des deux séries d'analyses pour servir de duplicat, et vérifier que la durée séparant les deux analyses n'avait pas d'incidence sur les analyses.

#### **2.5.2.2. Protocole expérimental**

L'hydrolyse est réalisée en mettant 0,5 mL d'acide chlorhydrique (HCl) à 6N dans chaque flacon. L'atmosphère des flacons est remplacée par de l'azote, pour éviter toute oxydation. Les échantillons sont laissés à hydrolyser pendant 24 heures dans une étuve à 110 °C. Après ce délai, les tubes sont laissés à refroidir puis mis à évaporer au SpeedVac (évaporateur rotatif, couplé à une pompe à vide), avant la neutralisation, effectuée avec un mélange de 20 µL d'eau, 20 µL de méthanol, 20 µL de triéthylamine (pour chaque fiole). Un standard interne d'acides aminés (STP : « *Amino-acid standard for hydrolyse analysis* » (Beckman System 7300/6300)) est également ajouté aux échantillons au moment de la neutralisation. Cette neutralisation permet également au PITC (Phénylisothiocyanate, un agent de dérivation) de se fixer sur les acides aminés libres. Pour la dérivation, on prépare un mélange de 140 µL de méthanol, 20 µL d'eau, 20 µL de triéthylamine et 20 µL de PITC. 20 µL de ce mélange sont versés dans chaque fiole, fioles qui sont ensuite agitées. Après 20 minutes pour laisser la dérivation se faire, les échantillons sont mis une nouvelle fois à évaporer dans le SpeedVac pendant une nuit. Au matin, après l'ajout de 120 µL d'éluant A et une agitation, les échantillons sont filtrés (0,45 µm) et transvasés dans des flacons (avec réducteurs de volume) pour l'analyse par HPLC.

### 2.5.2.3. Chromatographie

Pour déterminer la composition en acides aminés, les échantillons sont analysés à l'aide d'une HPLC (Thermo Finnigan), par chromatographie en phase inverse, avec une colonne Hypersil C18 5µm et un gradient d'acétonitrile. La composition moléculaire a été obtenue par calcul en utilisant les aires des pics des composés analysés, et le standard d'acides aminés Beckmann (cf. référence plus haut). La quantité totale de composés protéinés solubles (exprimés en µg/g de lyophilisat) a été obtenue en ajoutant les masses individuelles des divers acides aminés des échantillons.

### 2.5.3. Analyse des sucres

La composition en monosaccharides des échantillons issus de la fossilisation expérimentale a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (GC) après hydrolyse acide douce (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2M) et silylation.

#### 2.5.3.1. Echantillons préparés

Le tableau ci-après compile les masses d'échantillons utilisées pour l'analyse des monosaccharides :

**Tableau 2-II : Masses de lyophilisat utilisées pour l'analyse des monosaccharides. Le résultat final des analyses, et le second ajout éventuel de Trisyl sont précisés.**

Echantillon	Masse (mg)	Résultat	Second ajout de Trisyl
<i>Etat naturel</i>	147,8	Ok	
<i>24 heures</i>	54,8	Ok	
<i>1 semaine</i>	165,5	n.d.	
<i>1 mois</i>	145,7	Ok	✓
<i>2 mois</i>	154,1	Ok	
<i>1 an</i>	151,6	Ok	✓
<i>1 an (surnageant)</i>	145,8	n.d.	✓

Pour certains échantillons qui n'ont pas montré de pics lors de leur première analyse, 100  $\mu\text{L}$  de Trisyl ont été rajoutés puis les échantillons ont été ré-analysés. Cependant, seul l'échantillon fossilisé pendant 1 an a donné des résultats lors de ce second passage.

### **2.5.3.2. Protocole expérimental**

Environ 150 mg d'échantillon lyophilisé sont pesés et versés dans des tubes à essais en Pyrex étanches. 2,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 1.2 M (sauf pour l'échantillon fossilisés pendant 1 mois, pour lequel on a utilisé du HCl 1,5 N) sont versés dans chaque tube. Après y avoir fait le vide, ceux-ci sont placés dans une étuve à  $100^\circ\text{C}$  pendant 3 heures. Au sortir de l'étuve, on les place un instant dans l'eau pour les refroidir. Le standard interne est ajouté à ce moment : 50  $\mu\text{L}$  de 6-deoxy D-glucose sont versés dans chaque tube. Après transvasement dans des tubes coniques, le pH des échantillons est ensuite neutralisé par ajout de  $\text{CaCO}_3$  en poudre (contrôle par papier pH). Le précipité de  $\text{CaSO}_4$  obtenu est éliminé par centrifugation (20 minutes, 3000 rpm) et les échantillons sont séchés (RotoVap). On ajoute enfin 0,5 mL d'un mélange  $\text{LiCoO}_4$ /Pyridine, préparé à partir de 15 mL de Pyridine et de 30 mg de chlorure de lithium. Après une nouvelle centrifugation (5 minutes à 6600 rpm), le surnageant est placé dans les flacons est mis en étuve à  $60^\circ\text{C}$  pour la nuit. Finalement, on ajoute 100  $\mu\text{L}$  de Trisyl (N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) + trimethylchlorosilane (TMCS) ; Sigma). Après une heure en étuve à  $60^\circ\text{C}$ , les échantillons sont analysés par chromatographie en phase gazeuse.

### **2.5.3.3. Chromatographie en phase gazeuse**

Le dosage des monosaccharides est effectué par chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec un Auto System XL (Perkin-Elmer) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne capillaire CP-Sil 5CB (diamètre interne : 0,32 mm ; 25 m de long ; épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$ ). Après injection fuite fermée à  $240^\circ\text{C}$ , l'analyse a été réalisée dans les conditions suivantes : maintien de la température du four à  $60^\circ\text{C}$  durant 1 minute, puis montée à  $120^\circ\text{C}$  à  $30^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ , puis jusqu'à  $240^\circ\text{C}$  à  $3^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$  et maintien à cette dernière température jusqu'à élution de la totalité des produits. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur. L'identification des produits par leur temps de rétention et leur quantification

(via la détermination de leurs coefficients de réponse individuels) se fonde sur l'analyse d'un mélange des divers composés étudiés (standard externe), ainsi que sur le standard interne (6-deoxy D-glucose).

#### **2.5.4. Analyse des lipides**

Les analyses des acides gras et des n-alcanes ont été effectuées selon deux modes opératoires distincts. D'une part, après une thermochimiolysse (saponification) à l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) et d'autre part, après une hydrolyse acide classique. À l'issue de ces deux traitements les produits ont été analysés par CPG-SM (Couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse). Cependant, il convient de préciser (avec une certaine réserve en ce qui concerne la thermochimiolysse qui est encore de mise en oeuvre assez récente ; Disnar *et al.*, 2008), que l'hydrolyse et la saponification sont classiquement et respectivement supposées libérer des acides gras initialement engagés dans des liaisons esters et amides (Stefanova & Disnar, 2000 ; et références incluses). Quant aux lipides membranaires, ils ont été extraits par hydrolyse à l'acide iodhydrique (HI) puis réduction par le tétrahydroaluminate de lithium ( $\text{LiAlH}_4$ ).

##### **2.5.4.1. Échantillons préparés**

**Tableau 2-III : Masses de lyophilisat (ou d'échantillons sec pour les cellules et les EPS) utilisées avec chaque mode opératoire pour l'analyse des différents types de lipides.**

	Thermochimiolysse au TMAH (Acides gras, n-Alcanes)	Hydrolyse acide (Acides gras, n-Alcanes)	Hydrolyse à l'acide iodhydrique (Lipides membranaires)
	(mg)	(mg)	(mg)
<i>Etat naturel</i>	170,9	377,60	144,5
<i>Cellules</i>	n.d.	-	n.d.
<i>EPS</i>	n.d.	-	n.d.
<i>24 heures</i>	80,4	11	8
<i>1 semaine</i>	196,5	104,2	142,7
<i>1 mois</i>	225,7	292,5	127,1
<i>2 mois</i>	241,9	96,5	120,4
<i>1 an</i>	205,5	197,0	120,4
<i>1 an (surnageant)</i>	204,5	-	144,8

Le Tableau 2-III compile les masses d'échantillons utilisés pour les analyses des lipides, suivants les différentes méthodes d'extraction.

Les poids des échantillons « *Cellules* » et « *EPS* » n'ont pas pu être déterminés, en conséquence des faibles quantités de matière obtenue après évaporation de l'éthanol absolu dans lequel ces échantillons étaient conservés. Ces échantillons ont été obtenus après prélèvement de 400  $\mu$ L d'éthanol absolu avec des cellules en suspension, et de 1 mL avec les EPS

#### **2.5.4.2. Protocoles expérimentaux**

##### ***Extraction par thermochimiolysse au TMAH (acides gras)***

Dans chaque tube, contenant les masses précitées de lyophilisat, 100  $\mu$ L d'une solution de tetramethylammonium hydroxide solution (TMAH) sont versés (50  $\mu$ L seulement pour les *Cellules* et les *EPS*), ainsi que 50  $\mu$ L de standard interne (préparé à partir de 10,5 mg d'acide heptylbenzoïque dans 50 mL de méthanol), et 100  $\mu$ L de méthanol (50  $\mu$ L pour les *Cellules* et les *EPS*). Les tubes sont ensuite placés dans une étuve à 70°C pendant environ 1 heure. Au sortir de l'étuve, le vide est fait dans les tubes qui sont ensuite bouchés. On plonge alors l'extrémité des tubes dans un bain de sable à 250°C pendant 20 minutes. Le bas du tube est ainsi chauffé, faisant s'évaporer le contenu. En atteignant le haut du tube, à température ambiante donc plus froid, ces vapeurs condensent et retombent. Ce dispositif recrée ce qui se passe dans une colonne de distillation. Après refroidissement, on rajoute 1,5 mL d'éther pour redissoudre et récupérer le contenu des tubes. Le contenu des tubes est transvasé dans des flacons, qui sont mis à évaporer sous hotte.

Une fois secs, les échantillons sont redissous dans 100  $\mu$ L de dichlorométhane puis transvasé dans de nouveaux flacons avec réducteurs de volume. Ils sont alors prêts pour l'analyse par GC-MS.



***Extraction par hydrolyse acide (acides gras)***

Dans le cas des échantillons traités par hydrolyse acide, on verse dans les tubes contenant le lyophilisat 1 mL d'HCl 6N, 1 mL de méthanol, et 50 µL de standard interne (préparé à partir de 10,5 mg d'acide 4-heptylbenzoïque dans 50 mL de méthanol pour la première série ; préparé à partir de 1,0 mg de 5α-cholestane dans 10 mL de méthanol pour la seconde série). Les tubes sont laissés dans un bain Marie à 100°C pendant une nuit. Après cela, le contenu (sans le dépôt) est versé dans une ampoule à décanter avec quelques millilitres d'éther. Après plusieurs rinçages, la fraction éther (au dessus de la fraction aqueuse) est récupérée et mise à évaporer au RotoVap puis en étuve à 50°C pour compléter le séchage. Les échantillons sont repris dans 1,5 mL de méthanol anhydre et deux gouttes de chlorure d'acétyle, puis transvasés dans des flacons. Le tout est placé en étuve à 80°C pendant 2 heures pour une évaporation à sec, avant d'être repris dans 150 µL de dichlorométhane dans de nouveaux flacons avec réducteurs de volumes, avant injection dans la GC-MS.

***Extraction par HI (lipides membranaires)***

Dans les tubes contenant le lyophilisat, on verse 50 µL de standard interne (préparé à partir de 1,0 mg de 5α-cholestane dans 10 mL de méthanol) et 1 mL d'acide iodhydrique (HI, 55-58%). Les flacons sont ensuite placés dans un Bain-Marie à 100°C pendant 20 heures. On procède ensuite à une extraction au pentane (de la même manière que l'extraction à l'éther décrite au paragraphe précédent), après avoir dilué l'acide iodhydrique dans 3 mL d'eau distillée. Une fois la fraction pentane récupérée, on y ajoute une spatule de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sulfate de sodium anhydre) pour éliminer d'éventuelles traces d'eau. Après un transvasement dans de nouveaux tubes, le pentane est laissé à évaporer. Une fois sec, on ajoute dans chaque tube 2 mL de tétrahydrofurane (THF), puis quelques petites spatules de LiAlH<sub>4</sub>. Se produit alors une réaction exothermique. Les tubes sont placés ensuite en étuve à 70°C. Le LiAlH<sub>4</sub> est neutralisé par l'ajout progressif de petites quantités d'acétate d'éthyle (environ 1 mL au total), puis dissous par l'ajout de 2 mL d'HCl 6N et d'environ 6 mL d'eau distillée. On procède à une nouvelle extraction au pentane, identique à la précédente, mais sans utilisation du sulfate de sodium anhydre. Après évaporation, du pentane, les échantillons sont redissous dans 1 mL de pentane puis transvasés dans des petits flacons. Après une nouvelle évaporation, ils sont

repris dans 100  $\mu$ L d'acétate de méthyle dans de nouveaux flacons avec réducteurs de volumes, avant injection dans la GC-MS.

Les échantillons traités par thermochimiolysse au TMAH et par hydrolyse acide ont été analysés en deux fois. La première série d'analyses a surtout concerné la thermochimiolysse au TMAH, tandis que l'essentiel de l'extraction par hydrolyse acide a été réalisé lors de la seconde série. Pour l'extraction des lipides membranaires, les échantillons ont été traités en une seule fois.

Ainsi dans le cas des échantillons traités par thermochimiolysse au TMAH, les deux séries comprenaient les échantillons suivants :

- Première série : *24 heures, 1 semaine, 1 mois, 2 mois, 1 an, 1 an (surnageant), cellules, EPS.*
- Seconde série : *Etat naturel, 24 heures (duplicat).*

Pour les échantillons traités par hydrolyse acide :

- Première série : *Etat naturel, 1 mois, 1 an.*
- Seconde série : *Etat naturel (duplicat), 24 heures, 1 semaine, 2 mois.*

Enfin, pour les échantillons traités au HI :

- Série unique : *Etat naturel, 24 heures, 1 semaine, 1 mois, 2 mois, 1 an, 1 an (surnageant), cellules, EPS.*

Lorsque les échantillons ont fait l'objet de deux analyses, les résultats sont présentés sous forme de moyenne.

#### **2.5.4.3. Chromatographie – Spectrométrie de masse (GC-MS)**

L'analyse des lipides, quel que soit le protocole d'extraction utilisé, a été réalisée par GC-MS avec le système GC Trace 2000, associé à un spectromètre de masse Polaris à trappe à ion, de chez Thermo Quest. La GC était équipée d'une colonne Restek Rtx 5 Sil MS (longueur : 30 mètres ; diamètre interne : 0,25 mm ; film de 5 % de diphenyl et 95 % de diméthyl polysiloxane ; épaisseur du film : 0,25 $\mu$ m). 2  $\mu$ L d'échantillon ont été injectés à chaque fois. Après injection à 280°C, l'analyse a été réalisée dans les conditions suivantes : maintien de la température du four à 40°C durant 1 minute, puis montée à 120°C à 30°C.min<sup>-1</sup>, puis jusqu'à 240°C à 5°C.min<sup>-1</sup> et maintien à cette dernière température jusqu'à élution de

la totalité des produits. L'hélium à débit constant (1 mL/min) est utilisé comme gaz vecteur. Les produits ont été identifiés par leur temps de rétention et leurs spectres de masse, leur quantification se fondant sur le standard interne. La méthode de quantification des composés analysés sera détaillée dans la partie Résultats (cf. paragraphe 3.6.4.1.).

## **Troisième partie : Résultats**

### **3.1. Fossilisation expérimentale d'Archées hyperthermophiles**

#### **3.1.1. Silicification expérimentale de *P. abyssi***

**Tableau 3-I : Silicification expérimentale de *P. abyssi* à une concentration en silice de 500 ppm. Bilan des observations : images MEB /MET et spectres présentés dans les figures.**

<b>Temps d'exposition</b>	<b>Témoins sans cellules</b>		<b>MEB</b>		<b>MET</b>
	<i>Micrographies</i>	<i>Spectres EDX</i>	<i>Micrographies</i>	<i>Spectres EDX</i>	
<i>Etat naturel</i>	-	-	Fig. 3-1a	Fig. 3-1d	n.d.
<i>24 heures</i>	-	-	Fig. 3-1b/3-1c	Fig. 3-1e/3-1f	n.d.
<i>1 mois</i>	Fig. 3-4c	Fig. 3-4f	n.d.	n.d.	Fig. 3-2a/3-2b/ 3-2c /3-2d
<i>4 mois</i>	-	-	Fig. 3-3a/3-3b	Fig. 3-3c /3-3d	Fig. 3-3e/3-3f / 3-3g
<i>9 mois</i>	-	-	Fig. 3-4a/3-4b	Fig. 3-4d /3-4e	-
<i>1 an</i>	-	-	Fig. 3-5a/3-5b /3-5c	Fig. 3-5d /3-5e	Fig. 3-5f / 3-5g /3-5h/ 3-5i

Les cellules de *P. abyssi* sont des coques régulières d'environ 1 µm de diamètre (comme décrit par Erauso *et al.*, 1993), souvent observées en division (Fig. 3-1a). Elles peuvent former des agrégats qui ressemblent alors à des pontes de grenouille. A la fin de la culture, la densité cellulaire était très élevée. Par conséquent, les cellules ont été trouvées facilement et en grand nombre dans les échantillons. Des cellules apparemment intactes étaient encore observées en microscopie optique après 1 mois d'immersion dans l'agent silicifiant. En inoculant quelques millilitres de cet échantillon dans un milieu de culture nouvellement préparé, une croissance normale a été observée, et la fin de la phase exponentielle de croissance a été atteinte après deux journées (soit une de plus qu'en temps normal). Cela montre qu'au moins une partie des cellules étaient encore vivantes après ce long séjour en présence de silice. Des observations en microscopie optique ont suggéré que certaines cellules sont restées vivantes après plusieurs mois de silicification.

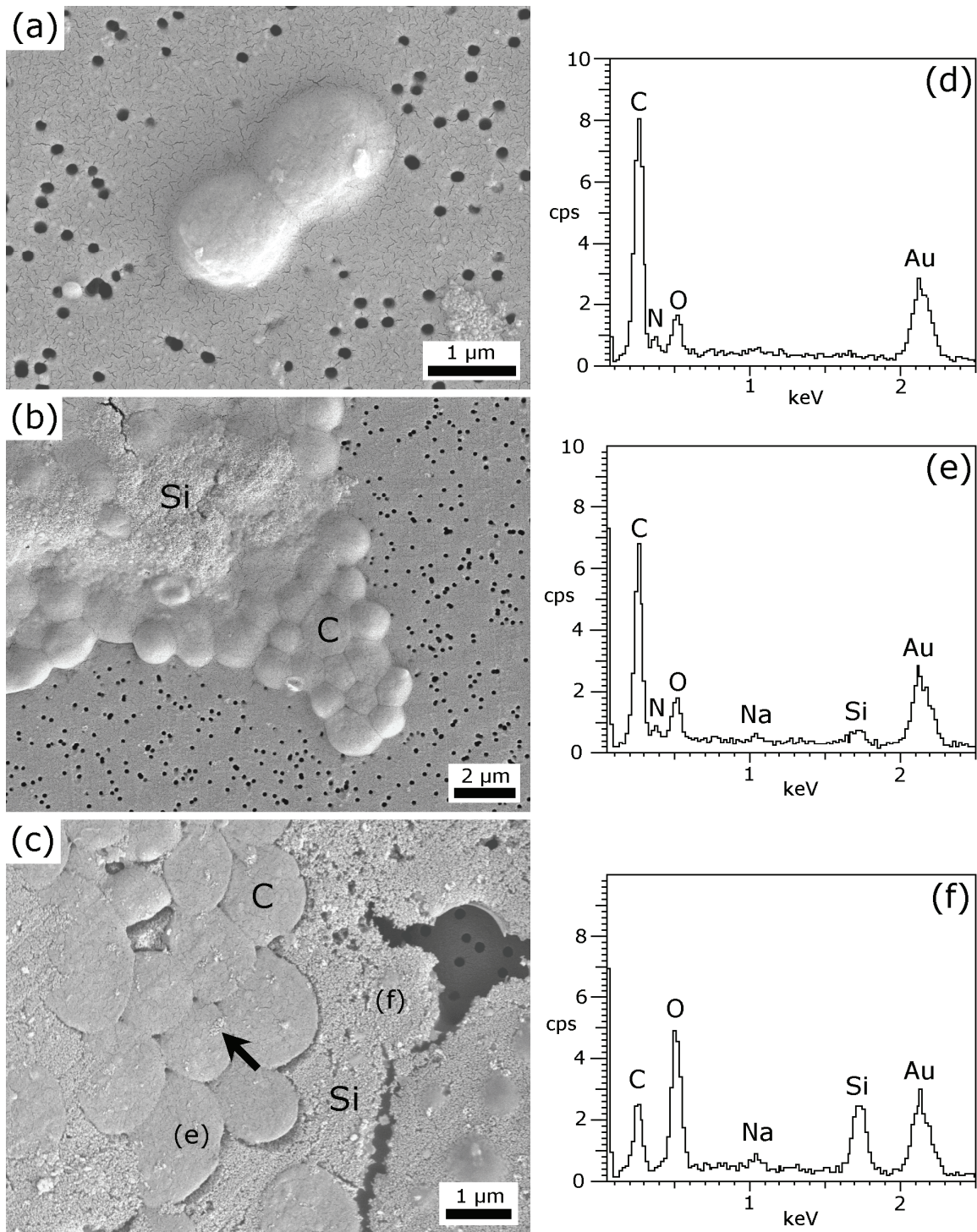
Le signal de l'or (Au) sur les spectres EDX (cf. Fig. 3-1d) est dû à la métallisation des échantillons, préalable à l'observation au MEB, et se retrouve sur tous les spectres. Les signaux du carbone (C), de l'azote (N) et de l'oxygène (O) ont été principalement attribués aux constituants organiques des cellules. Cependant, une partie des signaux du carbone et de l'oxygène des spectres EDX proviennent aussi du filtre Millipore en polycarbonate dans le cas d'échantillons de faible épaisseur (voir par exemple, les analyses faites sur des cellules isolées ; Fig. 3-1d, 3-3c et 3-4d).

Après 24 heures de silicification (Fig. 3-1b et 3-1c), l'échantillon présentait des cellules isolées ou en groupes recouvertes d'un matériau granuleux (fait de particules de 10 nm environ), ainsi que de larges dépôts granuleux contenant de nombreuses cellules (Fig. 3-1b et 3-1c). Les analyses EDX (Fig. 3-1f) indiquent que ce matériau, fait de fines particules, est de la silice. Bien qu'un faible signal du silicium apparaisse sur les spectres faits sur les cellules emprisonnées dans la matrice de silice (Fig. 3-1e), on ne peut dire avec certitude s'il s'agit d'un début de silicification des cellules. En effet, les spectres faits sur des cellules isolées ne montrent aucun pic du silicium. Il est donc probable que ce pic provienne de la silice qui enveloppe les cellules. Les cellules observées à la limite de la matrice de silice semblaient en bon état (Fig. 3-1b), tandis que celles emprisonnées dans le précipité (Fig. 3-1c) étaient légèrement déformées. Quelques petites particules de silice ont été vues sur la paroi des cellules présentes dans la matrice de silice (Fig. 3-1c, flèche), mais il est difficile de déterminer si cela vient d'une précipitation de silice sur la paroi, ou de particules de silice venant du précipité alentour. L'injection de la solution de silice a entraîné une légère augmentation du pH dans le milieu (Tableau 3-II), qui n'a plus bougé par la suite.

**Tableau 3-II : Suivi du pH durant la fossilisation expérimentale de *P. abyssi***

Temps d'exposition	Etat naturel	3 jours	1 mois (témoin sans cellules)	9 mois
<i>pH</i>	7,0	7,5	7,5	7,3

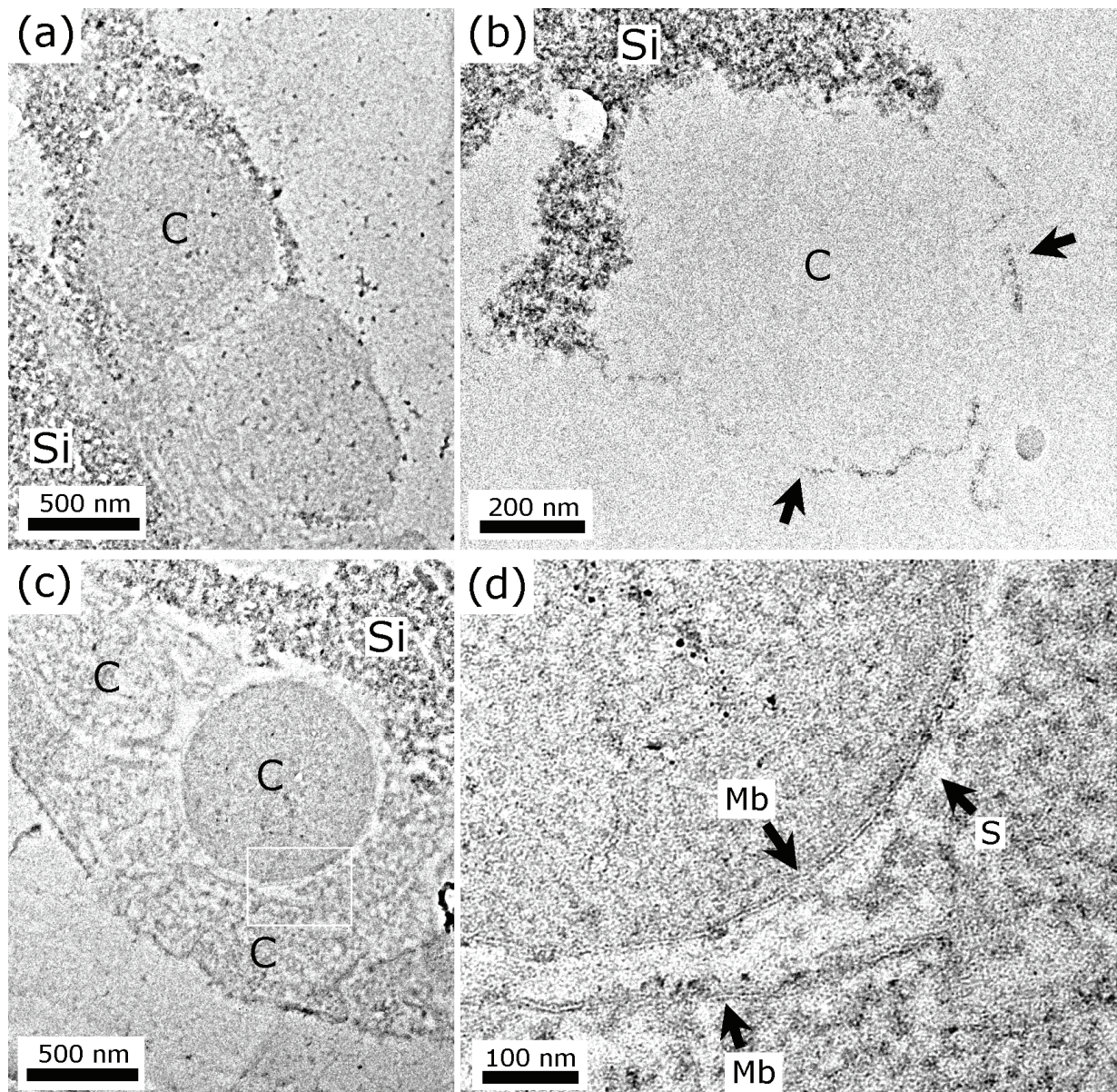
Sur les micrographies MET faites après 1 mois de fossilisation, le précipité de silice apparaît comme un matériau finement granuleux et dense aux électrons (Fig. 3-2a et 3-2c). Même si la plupart d'entre-elles sont légèrement déformées, les cellules de *P. abyssi* emprisonnées dans la matrice de silice sont encore intactes d'un point de vue cytologique, et contiennent encore du matériel cytoplasmique (moins dense aux électrons que la matrice de silice, Fig. 3-2a). Sur les coupes contrastées, on observe une très bonne préservation de la



**Silicification de *Pyrococcus abyssi* à une concentration de silice de 500 ppm.**

**Fig. 3-1 :** *Etat naturel et 24 heures de fossilisation* : Micrographies MEB, avec les spectres EDX correspondants, montrant des cellules de *P. abyssi* non fossilisées, et exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice à 500 ppm pendant 24 heures. **(a)** Cellules non fossilisées, en division, avec le spectre EDX correspondant **(d)**. **(b)** Agrégat de cellules (C) et de précipité de silice (Si). **(c)** Cellules piégées (C) dans le précipité de silice (Si), avec les spectres EDX correspondant **(e)** et **(f)** obtenus respectivement sur les cellules et le précipité de silice ; des particules de silice sont visibles sur la paroi des cellules (flèche). La localisation des analyses EDX est indiquée sur la micrographie (c). Noter le faible signal du sodium (Na) sur les spectres EDX. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV.

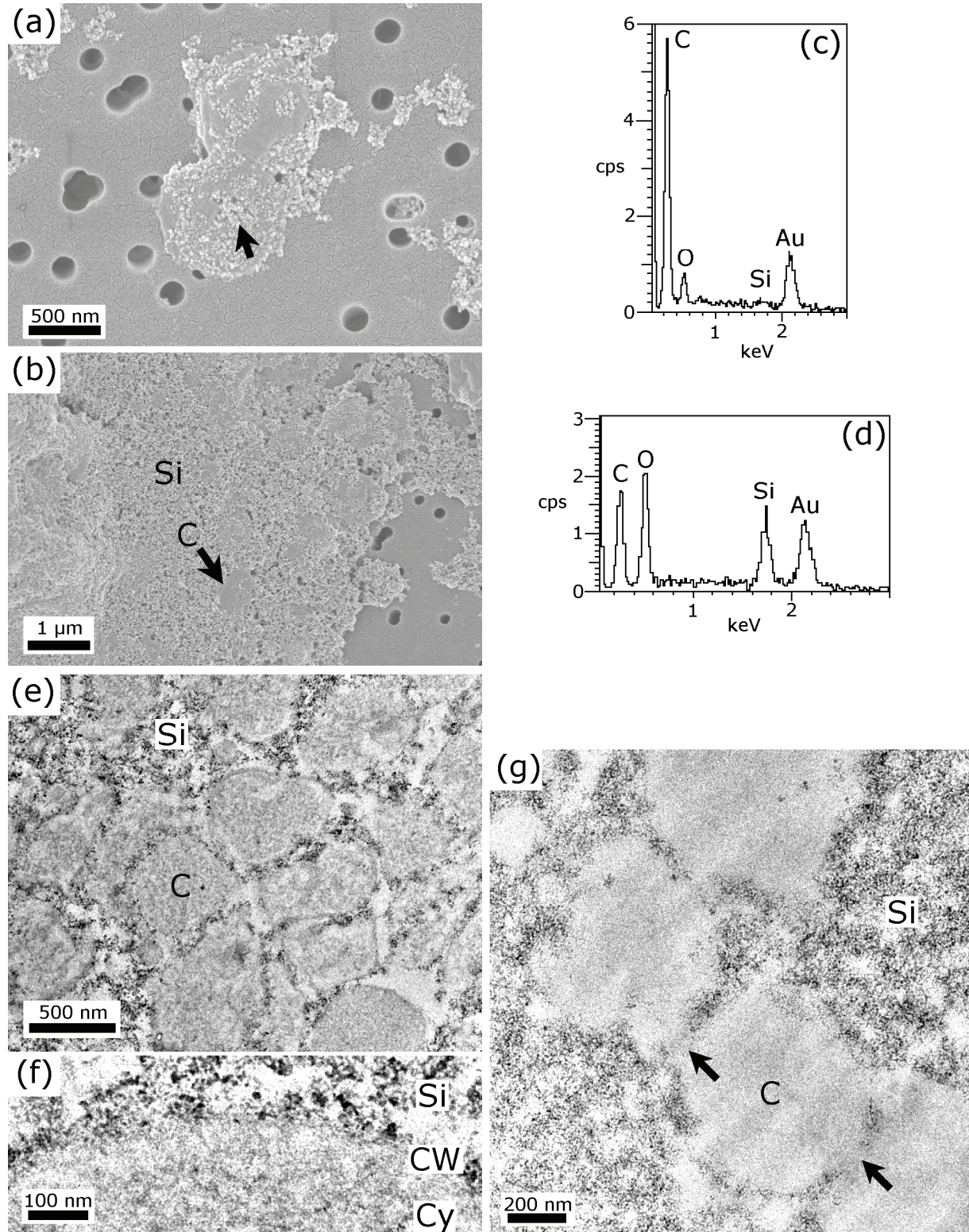




**Fig. 3-2 : Un mois de fossilisation :** Micrographies MET montrant des cellules de *P. abyssi* exposées dans leur milieu de culture pendant un mois à une solution de silice à 500 ppm. **(a)** Cellules en division, avec des dépôts de silice tout autour de la paroi. **(b)** Une fine couche de cristaux de silice (flèches), d'environ 10 nm d'épaisseur, qui recouvre la paroi cellulaire d'une cellule (C), est visible sur cette coupe non contrastée. Noter le contour irrégulier de la cellule. **(c)** Agrégat de cellules fortement déformées (et probablement lysées) et d'une cellule intacte et probablement toujours vivante (C), à proximité d'un précipité de silice (Si). **(d)** Vue rapprochée montrant la structure de la paroi de la cellule intacte (C), avec la membrane plasmique (Mb) et la S-Layer (S) nettement visible : la flèche du bas montre une membrane plasmique toujours visible pour une cellule complètement déformée. Toutes les micrographies MET ont été obtenues à un voltage de 200 kV.

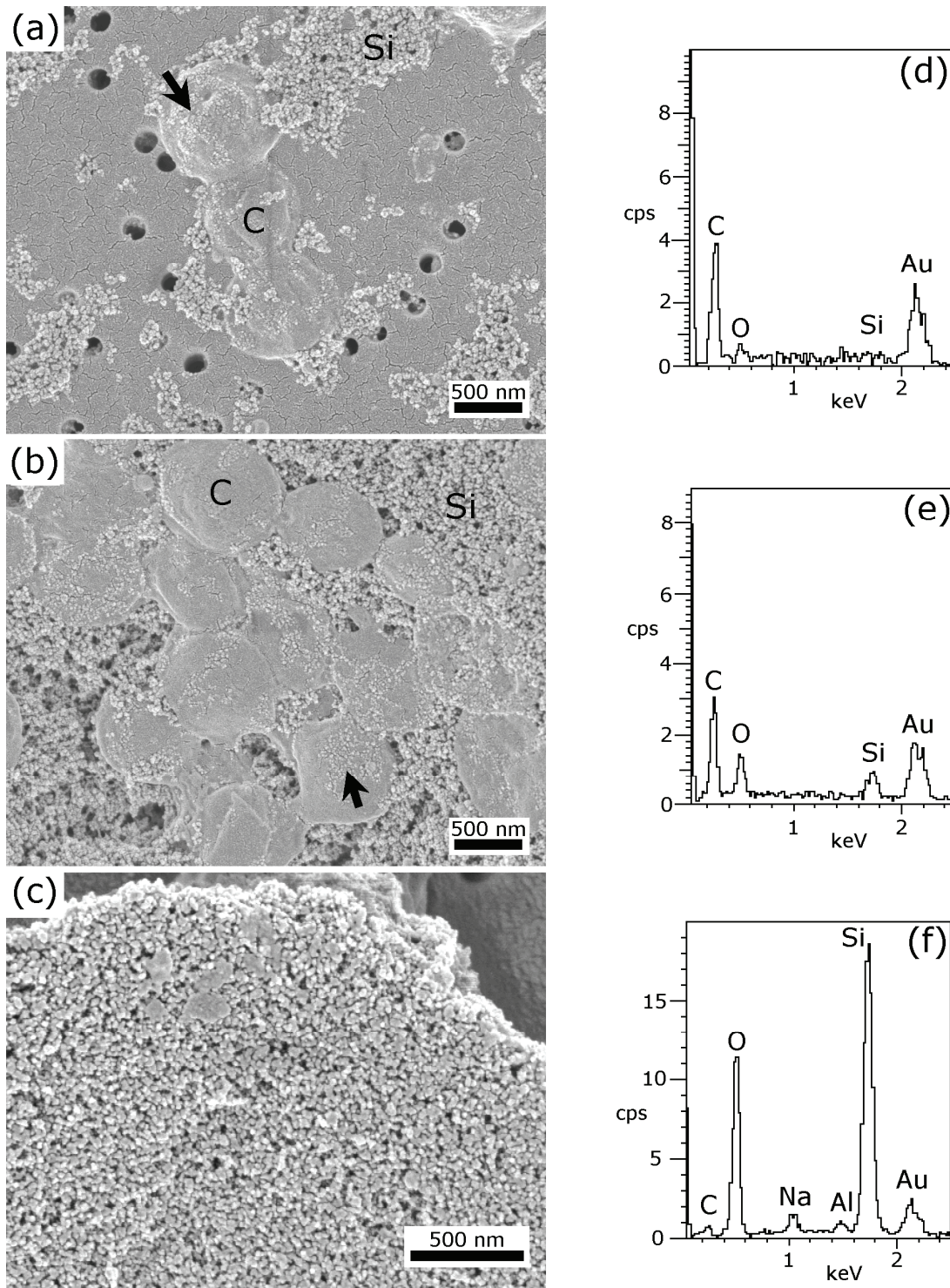


## Résultats



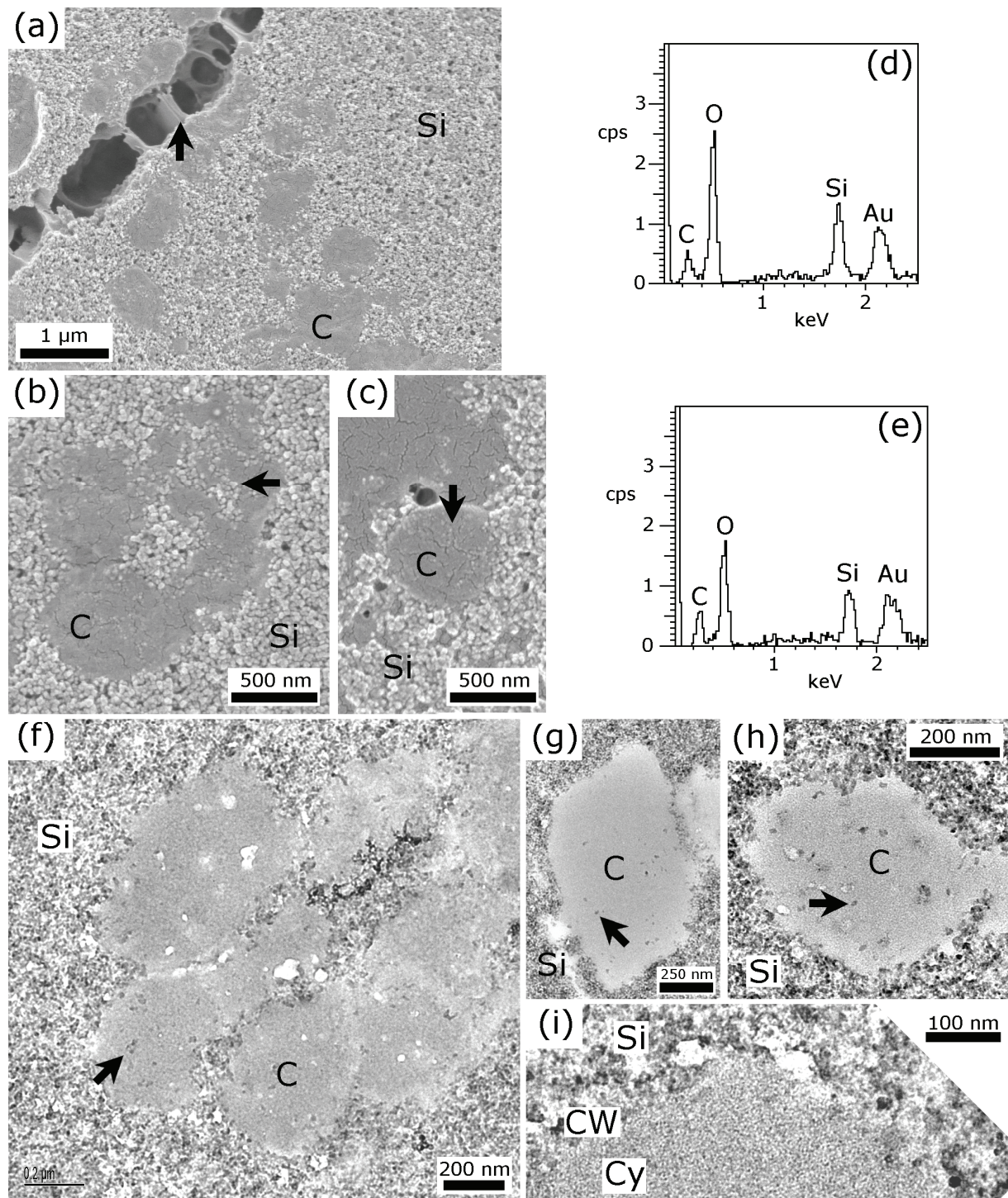
**Fig. 3-3 : Quatre mois de fossilisation :** Micrographies MEB et MET avec les spectres EDX correspondants, montrant des cellules de *P. abyssi* exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice à 500 ppm pendant 4 mois. **Micrographies MEB :** (a) Cellules isolées avec le spectre EDX correspondant (c) obtenu sur les cellules : des particules de silice qui ont précipité sur la paroi cellulaire sont nettement visibles (flèche). (b) Cellules (C) déformées et piégées dans le précipité de silice (Si), avec le spectre EDX correspondant (d) obtenu sur l'ensemble du précipité. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV. **Micrographies MET :** (e) Agrégat dense de cellules (C) dans le précipité de silice (Si) ; les cellules montrent une certaine déformation. (f) Vue rapprochée de la paroi cellulaire (CW) et du cytoplasme (Cy) montrant le précipité de silice (Si) en contact direct avec la paroi cellulaire ; la structure détaillée de la paroi est difficilement identifiable. (g) Coupe non contrastée. Le précipité de silice sur les parois cellulaires montre clairement la séparation entre les cellules. Cependant les cellules sont toujours attachées l'une à l'autre en certains points (flèches). Toutes les micrographies MET ont été obtenues à un voltage de 200 kV.





**Fig. 3-4 : Neuf mois de fossilisation, et échantillon témoin sans cellules :** Micrographies MEB, avec les spectres EDX correspondants, montrant des cellules de *P. abyssi* exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice à 500 ppm pendant 9 mois, ainsi que les échantillons témoins sans inoculation de cellules. **(a)** Cellules isolées (C) avec le spectre EDX correspondant **(d)** obtenu sur les cellules ; les cellules ne sont plus turgides et présentent une surface irrégulière et plissée ; les particules de silice qui ont précipité à la surface des cellules sont visibles (flèche). Noter l'absence de pic du sodium (Na) sur le spectre EDX. **(b)** Cellules piégées (C) dans le précipité de silice (Si), avec le spectre EDX correspondant **(e)** obtenu sur l'ensemble du précipité ; les particules de silice qui ont précipité sur la paroi des cellules sont visibles (flèche). **(c)** Précipité de silice formé spontanément dans le milieu de culture, après un mois, avec le spectre EDX correspondant **(f)**. Noter le pic du sodium (Na). Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV, l'exception de (f) obtenu à 10 kV.





**Fig. 3-5 : Un an de fossilisation :** Micrographies MEB et MET avec les spectres EDX correspondants, montrant des cellules et des EPS de *P. abyssi* exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice à 500 ppm pendant un an. Micrographies MEB : (a) Cellules (C) déformées et piégées dans le précipité de silice (Si) qui inclut également ce qui semble être des EPS ou des restes de cellules (flèche), avec le spectre EDX correspondant (d), obtenu sur l'ensemble du précipité. (b) Vue rapprochée sur les cellules (C) piégées dans le précipité de silice (Si) ; les particules de silice qui ont précipité à la surface des cellules sont visibles (flèche). (c) Cellule isolée (C) avec le spectre EDX correspondant (e), les particules de silice qui ont précipité à la surface des cellules sont visibles (flèche). Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV. Micrographies MET : (f) Agrégat dense de cellules (C) dans le précipité de silice (Si) ; les cellules montrent une certaine déformation. Noter la présence de particules de silice (flèche) à l'intérieur des cellules. (g) (i) Cellules piégées (C) dans le précipité de silice (Si). Noter l'absence de matériel cytoplasmique ainsi que la présence de particules de silice (flèche) à l'intérieur des cellules. (i) Vue rapprochée de la paroi cellulaire (CW) et du cytoplasme (Cy) montrant le précipité de silice (Si) en contact direct avec la paroi cellulaire. La structure détaillée de la paroi n'est plus identifiable. Toutes les micrographies MET ont été obtenues à un voltage de 200 kV.

structure de l'enveloppe cellulaire, où l'on peut clairement identifier la membrane cytoplasmique et la S-Layer (Fig. 3-2d, flèches). Les observations de coupes non contrastées permettent de voir un très fin dépôt de silice (moins de 10 nm d'épaisseur) qui a précipité sur la surface des cellules (Fig. 3-2b).

Après 4 mois de fossilisation, le dépôt de grains nanométriques de silice sur les parois des cellules est nettement visible sur les micrographies MEB (Fig. 3-3a, flèche), bien qu'aucun signal du silicium ne soit détecté sur les spectres EDX (Fig. 3-3c). Les micrographies MET montrent que nombreuses particules nanométriques de silice sont désormais présente à la surface des cellules et dans l'espace intercellulaire (Fig. 3-3e et 3-3g). Davantage de changements morphologiques sont observés : les cellules isolées (Fig. 3-3a) comme celles piégées dans la matrice de silice (Fig. 3-3b) présentent de nets signes de déformation, la surface des cellules ayant désormais un aspect plissé et irrégulier. Cependant, les micrographies MET indiquent que les cellules sont encore intactes d'un point de vue cytologique : il n'y a pas eu de perte de matériel cytoplasmique, et donc de lyse (Fig. 3-3e). La structure de la paroi cellulaire est visible, bien qu'elle soit plus difficile à discerner à cause de la précipitation directe de silice sur cette paroi (3-3f). La S-Layer n'est ainsi plus visible.

Après 9 mois de silicification, on peut voir une accentuation de la décomposition et de la déformation des cellules (Fig. 3-4a et 3-4b). Bien que des nanoparticules de silice (quelques dizaines de nm environ) puissent être observées à la surface des cellules (Fig. 3-4a et 3-4b, flèches), la quantité de silice est visiblement toujours insuffisante pour être détectée sur les spectres EDX réalisés sur des cellules isolées (Fig. 3-4d).

Un an après le début de la fossilisation, les cellules apparaissent fortement déformées, qu'elles soient piégées dans la matrice de silice (Fig. 3-5a) ou qu'elles soient isolées (Fig. 3-5c). Des fractures dans cette matrice, provoquées par la dessiccation par la méthode du point critique, laissent apparaître une substance lisse et élastique, très vraisemblablement soit des EPS secrétées par les cellules, soit des restes de cellules (Fig. 3-5a). Les nanoparticules de silice composant la matrice de silice sont sensiblement plus arrondies et plus grosses que celles observées aux précédents stades de fossilisation, ce qui tend à indiquer une polymérisation continue de la silice tout au long de cette année de fossilisation expérimentale. Ces particules de silice qui sont visibles à la surface des cellules, semblent cependant présentes en moins grand nombre au bout d'un an qu'après 9 mois de fossilisation (Fig. 3-5b).

et 3-5c). Le pic de silicium du spectre EDX obtenu sur la cellule présentée sur la Fig. 3-5c (Fig. 3-5e) est peut être dû aux particules de silice environnantes. Les micrographies MET montrent que la silice est maintenant présente dans tous les recoins de l'espace intercellulaire disponible (Fig. 3-5f). Bien que déformées, certaines cellules ont conservé leur matériel cytoplasmique dans lequel quelques particules de silice sont également visibles (Fig. 3-5f). Une observation à plus fort grandissement (Fig. 3-5i) montre que la précipitation de silice sur la paroi masque maintenant tous les détails de la structure de cette paroi. En revanche, d'autres cellules qui ont perdu le contenu de leur cytoplasme après avoir lysé (Fig. 3-5g et h) ont conservé des éléments de leur membrane demeurés liés à la matrice de silice, qui a gardé la forme des cellules. Des particules de silice, qui sont également visibles à l'intérieur des cellules vides, témoignent sans doute d'un début de remplissage de cet espace par la silice.

### **3.1.2. Silicification expérimentale de *M. jannaschii***

**Tableau 3-III : Silicification expérimentale de *M. jannaschii* à une concentration en silice de 500 ppm. Bilan des observations : images MEB/ MET et spectres présentés dans les figures.**

Temps d'exposition	Témoins sans cellules		MEB		MET
	Micrographies	Spectres EDX	Micrographies	Spectres EDX	
<i>Etat naturel</i>	-	-	Fig. 3-7a/3-7b	3-7c /3-7d	n.d.
<i>24 heures</i>	-	-	Fig. 3-8a	Fig. 3-8b/3-8c	Fig. 3-8d/3-8e/ 3-8f/3-8f/3-10c/ 3-10d/3-10e
<i>1 semaine</i>	-	-	Fig. 3-9a/3-9b	Fig. 3-9e	-
<i>1 mois</i>	Fig. 3-10a	Fig. 3-10b	Fig. 3-9c	Fig. 3-9f	-
<i>1 an</i>	-	-	Fig. 3-9d	Fig. 3-9g	-

Dans leur état naturel (Fig. 3-7a et 3-7b), les cellules de *M. jannaschii*, de presque 1 µm de diamètre, présentent une surface plissée que Jones *et al.* (1983) ont comparée à celle de grains de raisin sec. Cet aspect n'est pas dû à un quelconque phénomène osmotique ou à une lyse. Les cellules sont liées entre-elles par d'abondantes quantités d'EPS (Fig. 3-7a, flèche). La Fig. 3-7b montre que les EPS forment un film consistant, avec occasionnellement des attaches filamenteuses vers les cellules (flèche). La culture ayant été obtenue dans un milieu de culture appauvri, les densités cellulaires n'ont jamais été élevées pour cette souche. La mesure de la masse de cellules a donné un poids sec de 17,8 mg/L de culture. Même s'il y a

## Résultats

des raisons de penser que ce résultat est vraisemblablement sous-estimé (la littérature parle plutôt de centaines de mg/L ; Mukhopadhyay *et al.*, 1999), cela souligne néanmoins les faibles quantités de cellules disponibles en fin de culture.

Les signaux du carbone (C), de l'azote (N) et de l'oxygène (O) des spectres EDX peuvent essentiellement être attribués aux composés organiques des cellules, et des EPS (Figs. 3-7c et 3-7d). Cependant, il convient de noter qu'aucun signal de l'azote n'a été détecté lors d'analyse d'EPS (Fig. 3-7d). Par ailleurs, comme pour *P. abyssi*, une partie des signaux du carbone et de l'oxygène provient du filtre en polycarbonate qui sert de support dans le cas d'échantillons peu épais.

L'injection de la silice a entraîné une nette augmentation du pH, qui est passé de 6,5 à 7,8 (Tableau 3-IV). Après 24 heures de contact avec la silice, les cellules vues au MEB semblent avoir conservé un bon état général (Fig. 3-8a), mais aucun précipité de silice n'a pu être mis en évidence sur la paroi des cellules, tant avec le MEB qu'avec le MET (Fig. 3-8a et 3-8d). De même, aucun signal du silicium n'a été détecté dans les spectres EDX réalisés sur les cellules (Fig. 3-8b). En revanche, un précipité blanc et gélatineux qui s'était formé en quelques heures, était visible à l'œil nu dans les flacons en verre contenant les échantillons (Fig. 3-6). Ce précipité se compose de granules d'une cinquantaine de nanomètres formant une structure alvéolaire qui est mélangée aux EPS (Fig. 3-8a). Les analyses EDX nous indiquent que ce précipité est bien de la silice (Fig. 3-8c). Le petit signal du carbone associé reflète probablement les EPS, bien que le filtre en polycarbonate puisse également y contribuer.

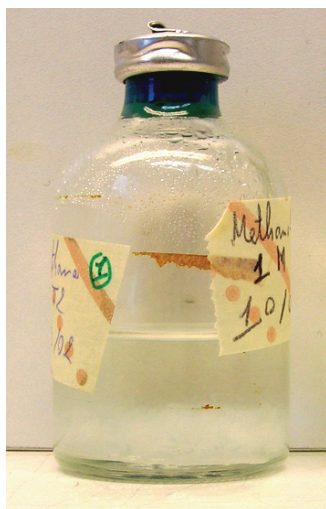


Fig. 3-6 : Précipité blanc de silice au fond des flacons de culture de *M. jannaschii*.

Tableau 3-IV : Suivi du pH au cours de la fossilisation expérimentale de *M. jannaschii*

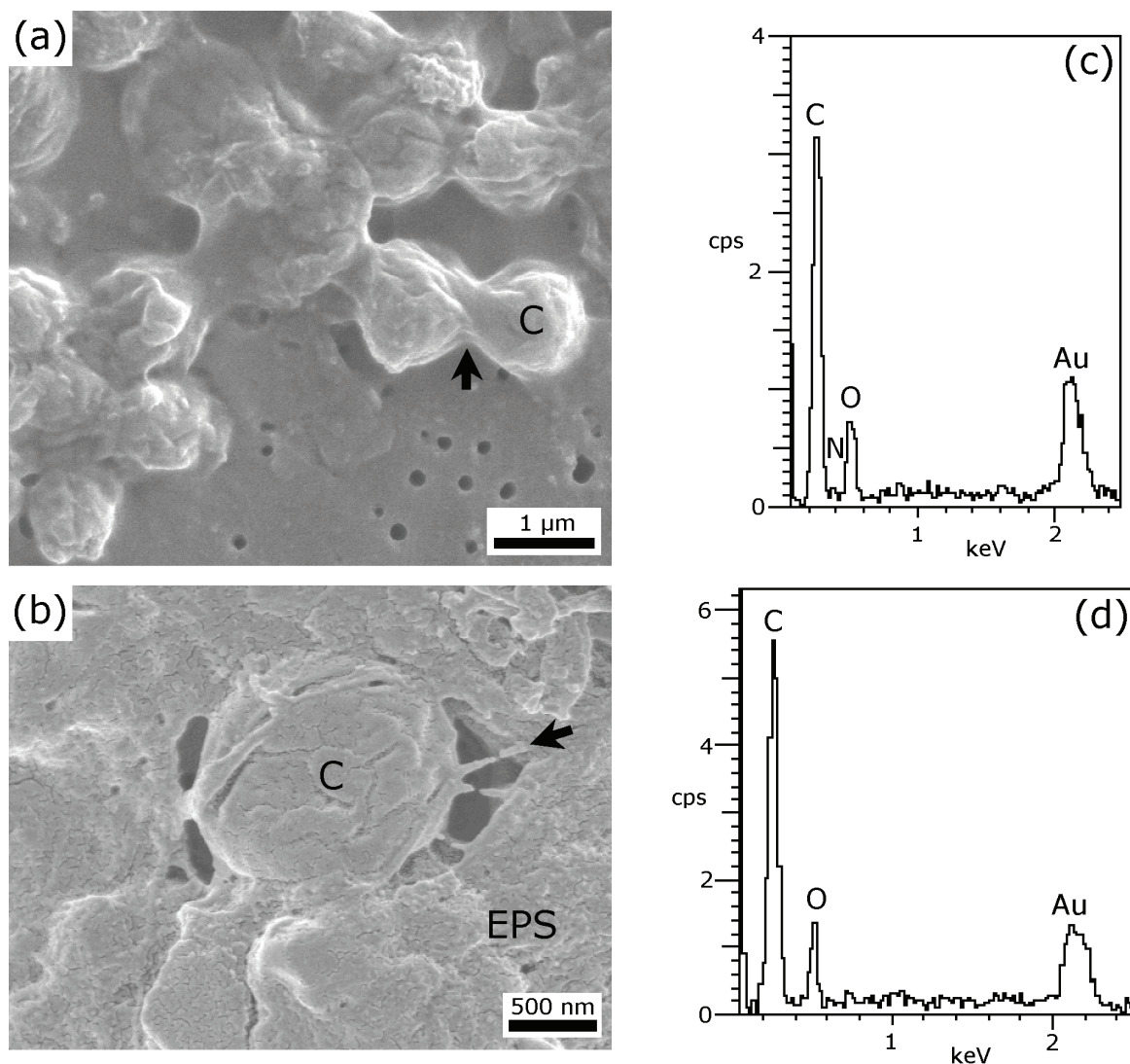
Temps d'exposition	Etat naturel	24 heures	1 mois	1 mois (témoin sans cellules)	1 an
<i>pH</i>	6,5	7,8	7,5	7,7	7,5

Les observations réalisées au MET après 24 heures, montrent des cellules au sein de cette matrice de silice. Comme on peut le constater sur les Figures 3-8d et 3-8g, lorsque ces cellules semblent être encore vivantes et non lysées, on ne voit généralement pas de granules de silice en contact direct avec l'enveloppe externe de la cellule. Ainsi les Figures 3-8d et 3-8g peuvent être comparées à la Figure 3-2b de la fossilisation de *P. abyssi*, où la silice avait précipité sur la paroi cellulaire au bout d'un mois. Dans certains cas on observe une zone vide d'environ 100 nm entre l'enveloppe de la cellule et le précipité de silice (Fig. 3-8d). A l'inverse, les cellules lysées sont complètement piégées dans la matrice de silice (Fig. 3-8e). Cependant, aucune particule de silice n'a pu être observée à l'intérieur des cellules.

Après une semaine d'incubation dans la solution de silice, certaines des rares cellules restantes étaient complètement lysées et déformées (Fig. 3-9a), tandis que d'autres étaient encore en bon état (Fig. 3-9b). Le précipité de silice était en partie lié aux cellules (Fig. 3-9a et 3-9b), mais les spectres EDX faits sur ces cellules ne montraient aucune trace de silicium (Fig. 3-9e). Par ailleurs, les observations faites en microscopie confirment la baisse du nombre de cellules dans le milieu d'incubation, la densité cellulaire observée y étant au bout d'une seule semaine, bien inférieure à celle de la culture.

Aucune structure pouvant être attribuée à des cellules ou à leurs restes n'a été vue au delà d'une semaine. Un mois après le début de la fossilisation, le seul élément qui pouvait être vu était le précipité de silice, avec toujours sa structure granuleuse et alvéolaire, à l'intérieur duquel des lambeaux d'EPS était clairement visibles (Fig. 3-9c) dans les fractures formées à la suite de la dessiccation par la méthode du point critique. Il est intéressant de noter le net signal du magnésium (Mg) présent sur les spectres EDX, certainement en lien avec la présence de  $MgCl_2$  dans le milieu de culture (Fig. 3-9f).

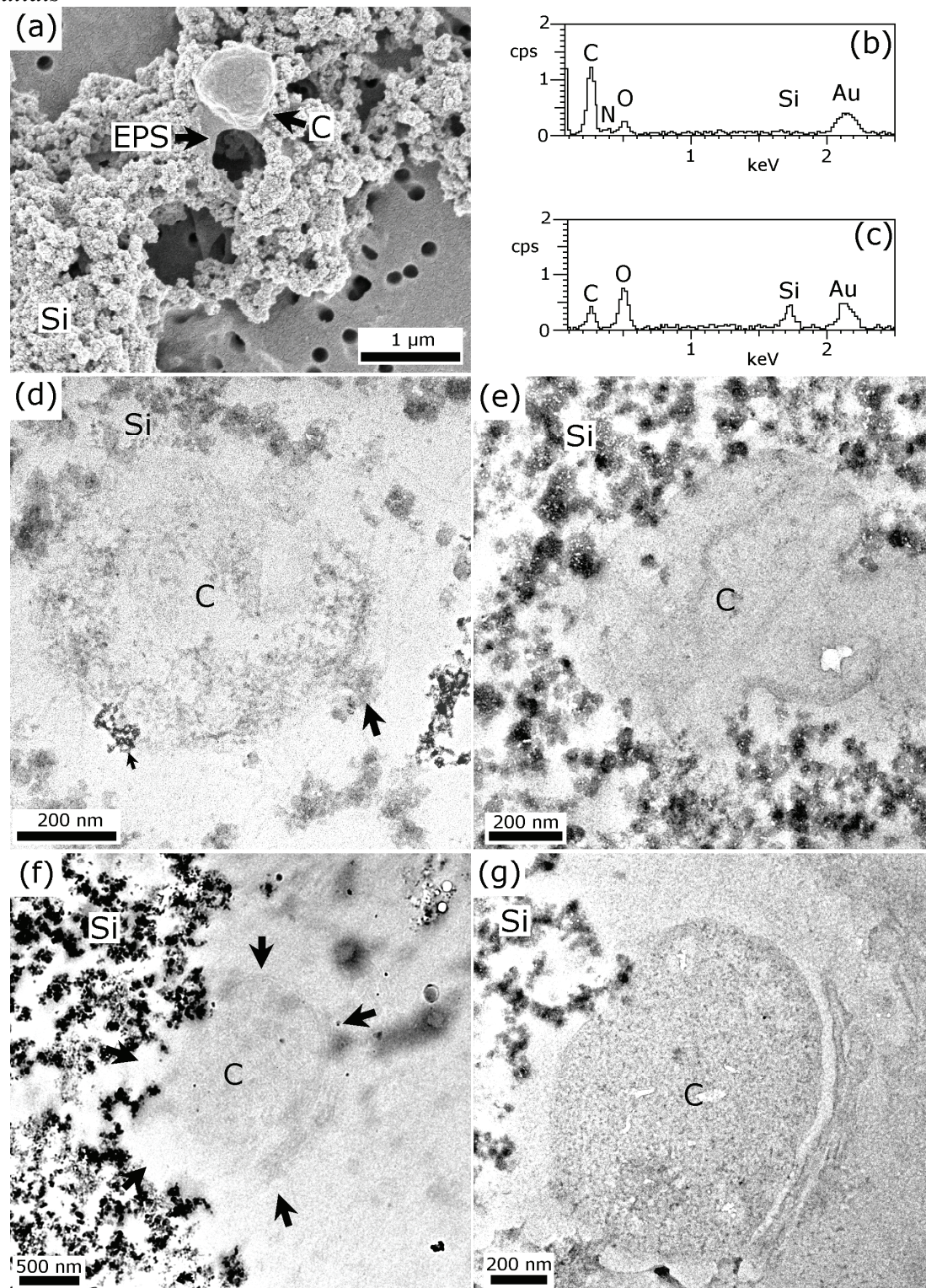




**Silicification de *Methanocaldococcus jannaschii* à une concentration de silice de 500 ppm.**

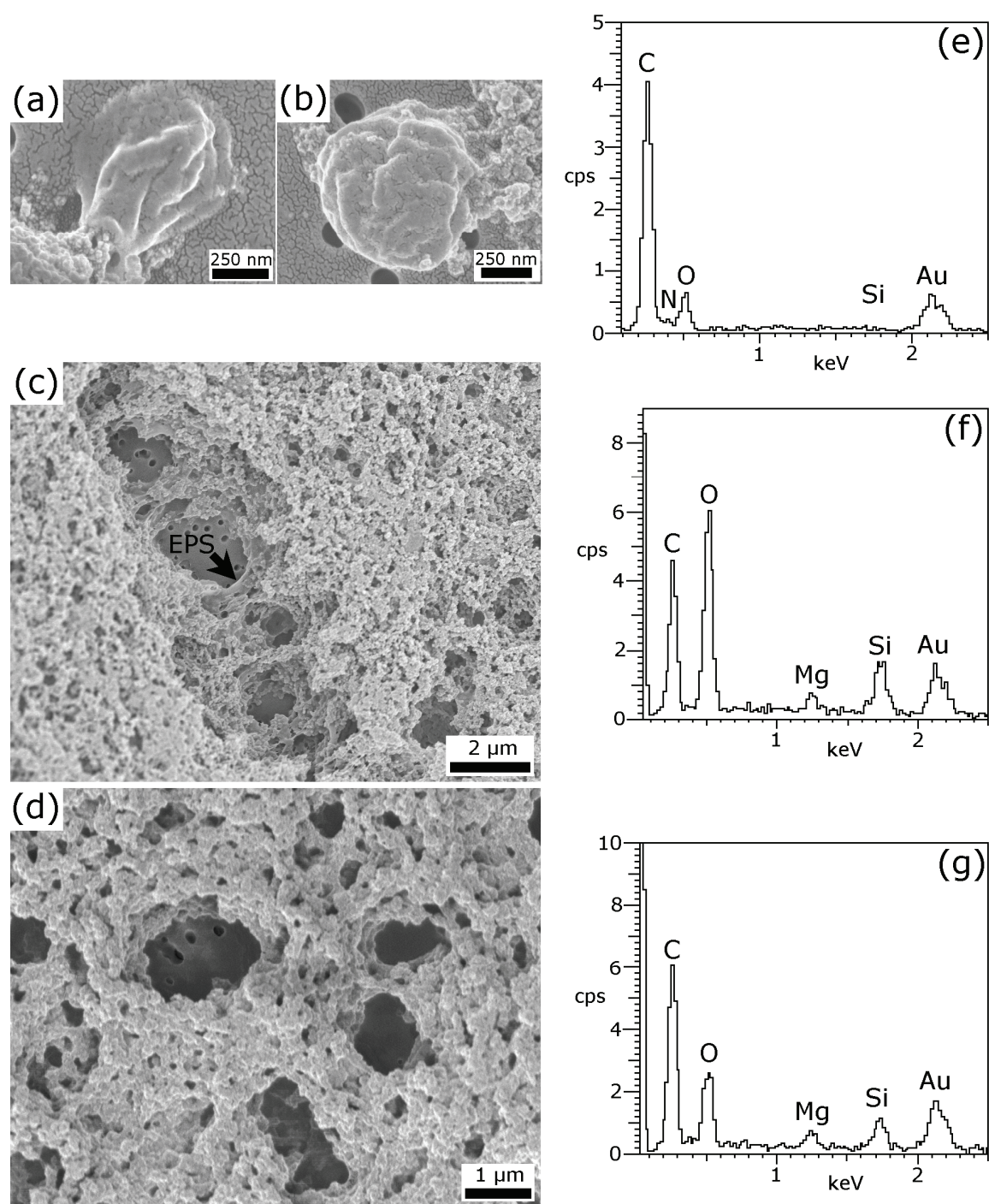
**Fig. 3-7 :** *Etat naturel* : Micrographies MEB montrant des cellules et des EPS de *M. jannaschii* non fossilisées. **(a)** Cellules en division, non silicifiées (C), liées par des EPS (flèche), avec le spectre EDX correspondant **(c)**. Noter la morphologie naturelle, irrégulière de la paroi cellulaire. **(b)** Cellule piégée (C) dans une matrice d'EPS (EPS) avec des EPS filamenteux (flèche), avec le spectre EDX correspondant **(d)** obtenu sur les EPS. Toutes les micrographies MEB ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV.



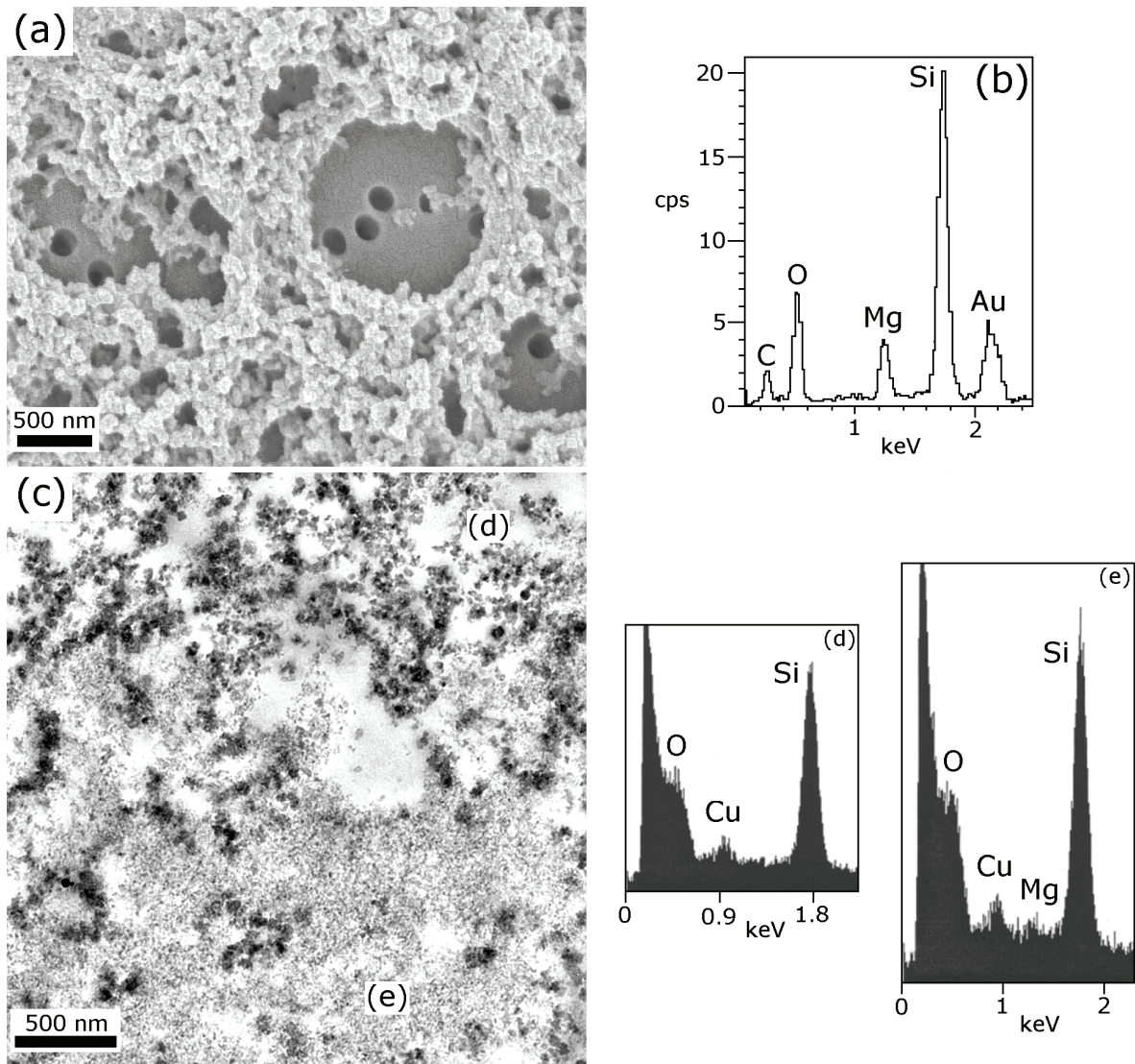


**Fig. 3-8 : 24 heures de fossilisation :** Micrographies MEB et MET avec les spectres EDX correspondants, montrant des cellules de *M. jannaschii* exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice à 500 ppm pendant 24 heures. Micrographies MEB : (a) Cellule (C) associée à la silice (Si) précipitée sur les EPS (EPS), avec les spectres EDX correspondants (b) et (c) obtenus respectivement sur une cellule isolée (non montrée) et sur le précipité de silice et EPS. Toutes les micrographies MEB ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV. Micrographies MET : (d) Cellule piégée (C) dans le précipité de silice (Si). Noter la zone apparemment vide autour de cette cellule. Des particules de silice ne semblent être en contact avec la paroi qu'en de rares endroits (flèche). Le précipité foncé (petite flèche) et un résidu de la préparation de l'échantillon. (e) Cellule lysée (C) entourée par le précipité de silice (Si). Il n'y a pas dans ce cas de zone vide autour de la cellule, et la silice précipitée est en contact direct avec la paroi cellulaire. (f) (g) Sections successives de la même cellule (C), non contrastée en (f), contrastée en (g). Le contour de la cellule est indiqué par des flèches pour (f). Le précipité de silice n'est en contact avec la paroi qu'en quelques endroits. En (g), les restes d'une structure microbienne non identifiée vus à la droite de la cellule intacte. Toutes les micrographies MET ont été obtenues à un voltage de 200 kV.





**Fig. 3-9 :** Une semaine, un mois et un an de fossilisation : Micrographies MEB, avec les spectres EDX correspondants, montrant des cellules et des EPS de *M. jannaschii* exposés dans leur milieu de culture à une solution de silice à 500 ppm pendant différentes périodes. **(a)** Une semaine ; cellule lysée. **(b)** Une semaine, cellule intacte avec le spectre EDX correspondant **(e)** obtenu sur la cellule. Noter l'absence de pic du silicium (Si) sur le spectre. **(c)** Un mois : noter la structure alvéolaire du précipité de silice (Si) sur les EPS (EPS). Aucune cellule n'a été observée. Le spectre EDX **(f)** a été obtenu sur l'ensemble du précipité. Noter le pic du magnésium (Mg) sur le spectre. **(d)** Un an : la structure alvéolaire du précipité de silice (Si) est davantage prononcée et les particules de silice sont sensiblement plus grandes. Le spectre EDX **(g)** a été obtenu sur l'ensemble du précipité. Toutes les micrographies MEB ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV.



**Fig. 3-10 : Témoins sans cellules :** Micrographie MEB (a), avec le spectre EDX correspondant (b), montrant le précipité de silice formé spontanément dans le milieu de culture de *M. jannaschii*, sans inoculation de bactéries. Noter la structure alvéolaire similaire à celle des échantillons avec cellules. Micrographie MET (c) du précipité de silice dans le milieu de *M. jannaschii* après 24 heures, qui contient un matériau moins dense. Les spectres EDX correspondants (d) et (e) indiquent que ce dernier est un précipité de silicate de magnésium. La localisation des analyses EDX est indiquée sur la micrographie (c). La micrographie MEB a été obtenue à un voltage de 2kV, et le spectre EDX avec un voltage de 10 kV. La micrographie MET et les spectres EDX ont été obtenus à un voltage de 200 kV.

Après 1 an de silicification, la structure alvéolaire du dépôt est toujours reconnaissable (Fig. 3-9d), mais la texture granuleuse semble être plus marquée et plus épaisse, probablement à la suite d'une polymérisation continue de silice. Les EPS ne sont plus visibles, soit en raison d'une totale décomposition, soit d'un recouvrement complet par la silice. Le fort signal du carbone sur les spectres EDX (Fig. 3-9g) semble confirmer cette seconde hypothèse.

### **3.1.3. Echantillons témoins, sans micro-organismes**

Le précipité de silice s'est formé spontanément dans le milieu de culture témoin (i.e. sans cellules) aussi bien pour *P. abyssi* que pour *M. jannaschii*. En ce qui concerne le milieu témoin de la série réalisée avec *P. abyssi*, le précipité est morphologiquement similaire à celui qui s'est formé en présence de cellules : une matrice dense, finement granuleuse avec des particules de silice de l'ordre de 10 nm (Fig. 3-4c). Les analyses EDX faites sur ce précipité ont montré la présence de sodium (Na) (Fig. 3-4f). Le faible signal du carbone est certainement dû au filtre support en polycarbonate. Dans le milieu témoin de *M. jannaschii*, le précipité de silice ressemble également à celui formé en présence de cellules : il présente une texture alvéolaire, faite de grains de silice de 50 nm environ (Fig. 3-10a). Cependant, dans ce cas, on note l'absence apparente des EPS qui faisaient partie intégrante du précipité dans le milieu avec culture de cellules (comparer Fig. 3-10a et 3-9c). Le spectre EDX de ce précipité (Fig. 3-10b) montre un léger pic du carbone (probable dû au filtre en polycarbonate) et un pic du magnésium, en parallèle de celui du silicium.

Les micrographies MET du dépôt de silice formé dans le milieu de *M. jannaschii*, apportent des informations supplémentaires sur la structure interne de ce dépôt (Fig. 3-10c). Une grande partie de ce dépôt est faite d'un matériau granuleux, dense aux électrons, et qui a été interprété comme étant le précipité de silice. Le dépôt était cependant hétérogène, et incluait des particules plus petites, à la granulation beaucoup plus fine, formant un matériau moins dense aux électrons que la silice. Les analyses EDX montrent que le dépôt grisâtre est un silicate de magnésium (Fig. 3-10d et 3-10e).

## 3.2. Fossilisation expérimentale de Bactéries

### 3.2.1 Silicification expérimentale de *Rhodovulum sp.*

Tableau 3-V : Silicification expérimentale de *Rhodovulum sp.* à une concentration en silice de 500 ppm, à température ambiante et à 60°C. Bilan des observations : images MEB et spectres présentés dans les figures.

Temps d'exposition	Fossilisation à T°C ambiante		Fossilisation à 60°C	
	Micrographies	Spectres EDX	Micrographies	Spectres EDX
<i>Etat naturel</i>	Fig. 3-12a/3-12b	Fig. 3-12c	-	-
<i>24 heures</i>	-	-	Fig. 3-14a/3-14b	Fig. 3-14c /3-14d
<i>1 mois</i>	Fig. 3-13a	Fig. 3-13b	Fig. 3-14e /3-14f	Fig. 3-14g /3-14h
<i>9 mois</i>	Fig. 3-13c /3-13d	Fig. 3-13e	-	-

De toutes les souches qui ont été fossilisées expérimentalement, *Rhodovulum sp.* est la seule à ne pas être thermophile. Elle a été fossilisée expérimentalement à 60°C, ainsi qu'à température ambiante. La comparaison des deux fossilisations met en évidence l'influence indirecte de la température sur ce processus.

A l'état naturel, les cellules de *Rhodovulum sp.* sont des bâtonnets irréguliers, de longueur variable (entre 0,8 et 1,0  $\mu\text{m}$ ), et d'environ 0,3-0,4  $\mu\text{m}$  de largeur. A la fin des cultures, les cellules étaient présentes en grand nombre (comme en témoignait le trouble des cultures). De ce fait, les bactéries ont pu être repérées aisément dans les échantillons où elles abondaient (Fig. 3-12a). Les cellules étaient souvent vues groupées (Fig. 3-12b) et en division. Vues de près, on voit que les cellules sont liées par des EPS à l'aspect collant (Fig. 3-12b, flèche), et que leur paroi est recouverte d'une fine dentelle d'EPS.

#### 3.2.1.1. Silicification à température ambiante

Lors de la fossilisation menée à température ambiante, les conséquences de l'injection de la silice dans les cultures furent particulièrement spectaculaires. En quelques jours, un précipité floconneux de couleur rouge-brun s'est formé et a progressivement décanté au fond des flacons de culture, laissant le surnageant parfaitement limpide et incolore (Fig. 3-11). Cela suggère que la silice, en précipitant, a entraîné avec elle l'ensemble des cellules du milieu.





**Fig. 3-11 : Flacons de culture de *Rhodovulum sp.* Le flacon de gauche présente une culture brute. Le contenu du flacon de droite a été fossilisé pendant 2 mois à température ambiante.**

Si ce phénomène a pu se produire pour les autres souches fossilisées, il a été surtout remarqué dans le cas de *Rhodovulum sp.*, du fait du trouble marqué et coloré provoqué par les cellules, ainsi que de l'absence d'éléments minéraux en suspension dans le milieu de culture (comme le soufre, pour *P. abyssi*), qui auraient pu gêner l'observation.

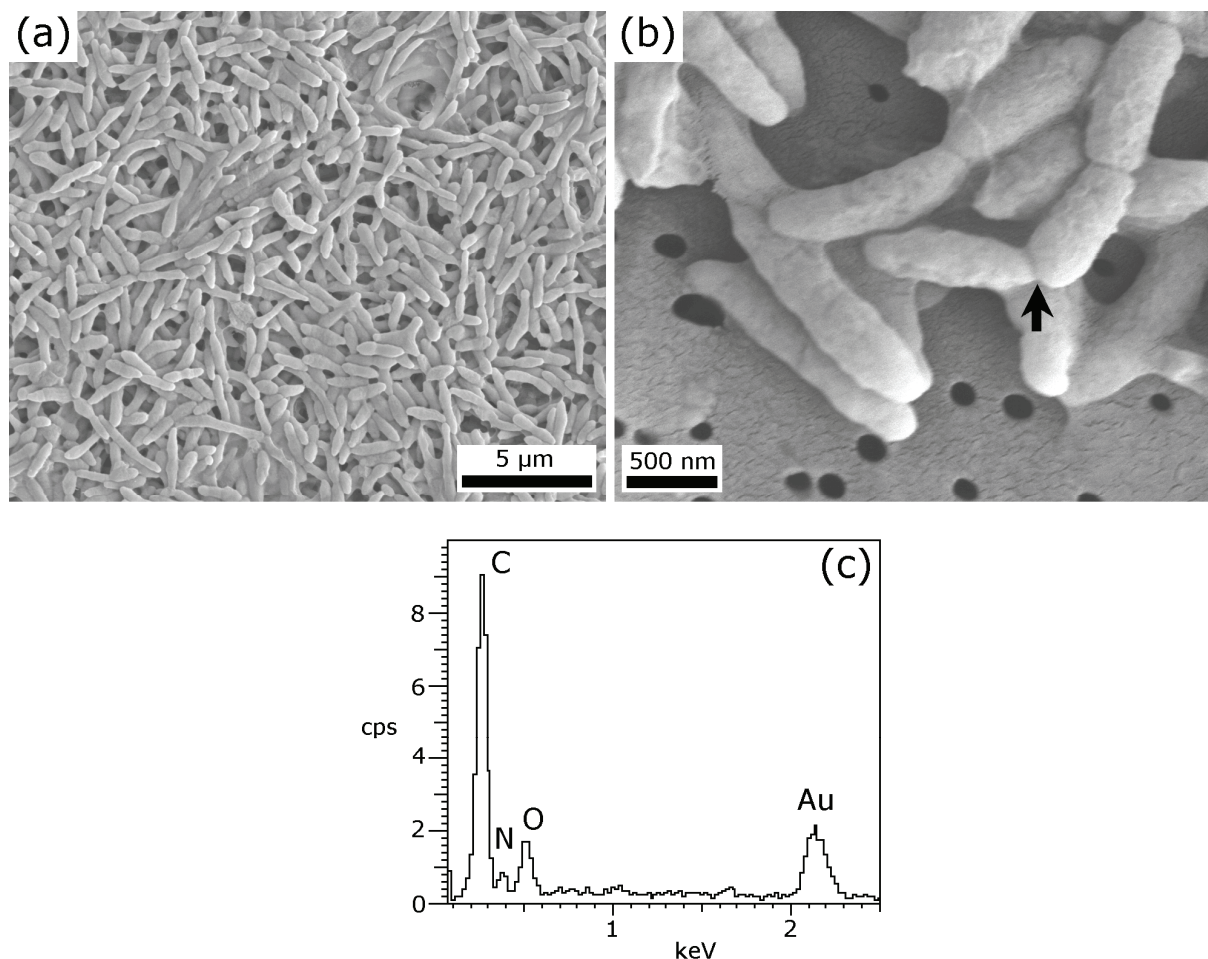
Comme pour *M. jannaschii*, l'injection de la silice a provoqué une nette augmentation du pH dans le milieu (Tableau 3-VI).

**Tableau 3-VI : Valeurs du pH au cours de la fossilisation expérimentale de *Rhodovulum sp.* à température ambiante.**

Temps d'exposition	Etat naturel	24 heures	1 mois	9 mois
<i>pH</i>	7,0	8,5	8,2	8,0

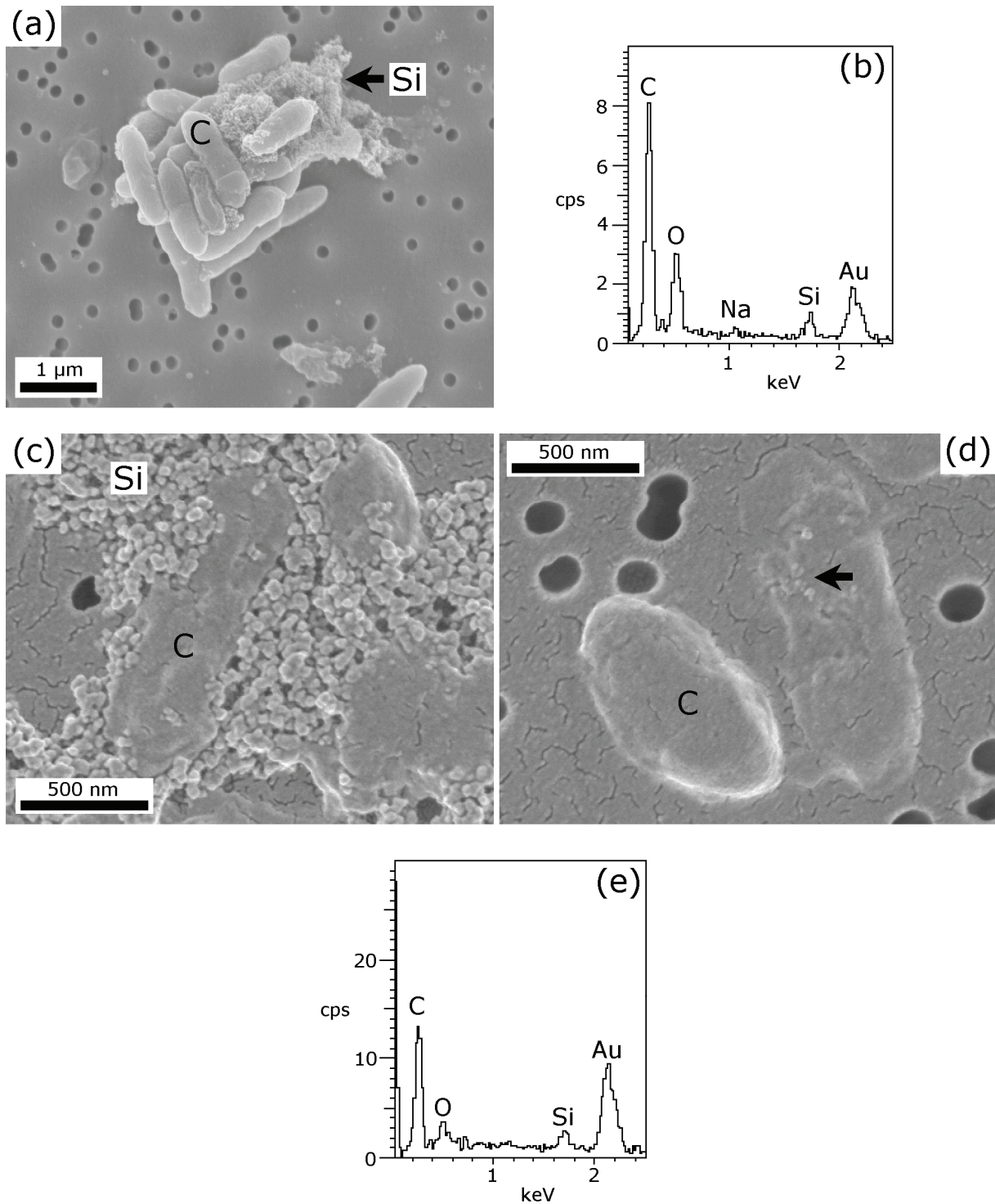
Après un mois de fossilisation à température ambiante, un dépôt granuleux était visible sur les échantillons observés au MEB (Fig. 3-13a). Les analyses EDX réalisées sur ce dépôt (Fig. 3-13b) ont montré des pics de silicium (Si) et d'oxygène (O), confirmant qu'il s'agit d'un précipité de silice. A cela s'ajoute du sodium (Na). Les particules de silice font de l'ordre de 20 nm de diamètre.

Les cellules sont visibles en grand nombre et en bon état, sans signe de déformation. Les observations en microscopie optique ont suggéré qu'une bonne partie d'entre elles étaient encore vivantes à ce stade de la fossilisation. Des particules de silice sont parfois visibles à la surface des parois cellulaires (Fig. 3-13a).



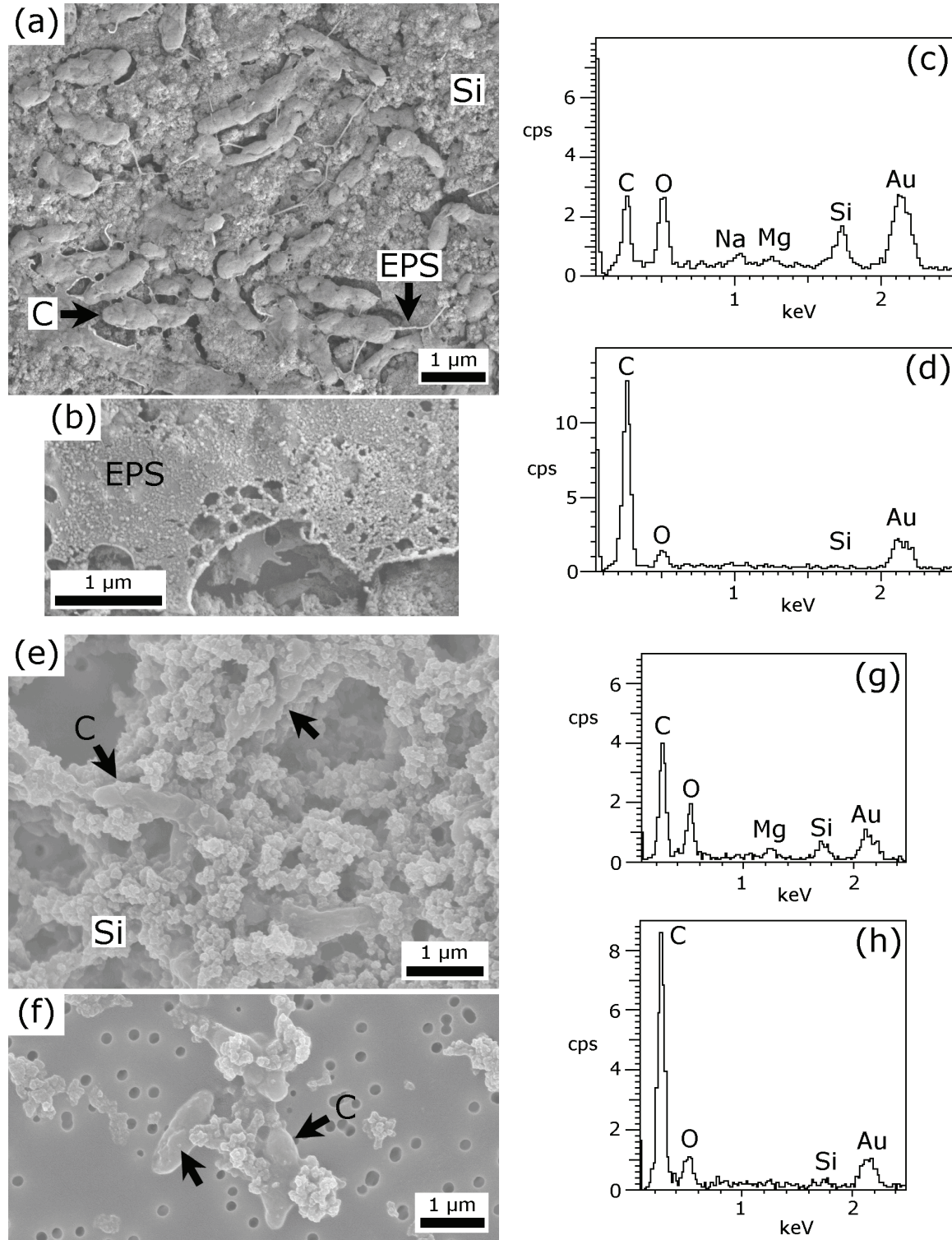
**Silicification de *Rhodovulum sp.* à une concentration de silice de 500 ppm**

**Fig. 3-12 :** *Etat naturel* : Micrographies MEB montrant des cellules et des EPS de *Rhodovulum sp.* non fossilisés. **(a)** Accumulation de cellules, non silicifiées, avec le spectre EDX correspondant **(c)**. **(b)** Vue rapprochée montrant des cellules liées par des EPS collants (flèche). Noter les fins EPS qui recouvrent la paroi des cellules. Toutes les micrographies MEB ont été obtenues à un voltage de 2kV, et le spectre EDX avec un voltage de 5 kV.



**Fig. 3-13 :** *Silicification à température ambiante* : Micrographies MEB, montrant des cellules de *Rhodovulum sp.*, exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice à 500 ppm pendant différentes durées, à température ambiante. **(a)** Un mois : agrégat de cellules (probablement toujours vivantes) (C), mêlées à un précipité de silice (Si). Le spectre EDX correspondant **(b)** a été obtenu sur l'ensemble. Noter le signal du sodium (Na). **(c)** Neuf mois : cellules piégées (C) dans le précipité de silice (Si), avec le spectre EDX correspondant **(e)** obtenu sur l'ensemble du précipité. **(d)** Neuf mois : cellules isolées (C) et déformées ; les particules de silice qui ont précipité à la surface des cellules sont visibles (flèche). Toutes les micrographies MEB ont été obtenues à un voltage de 2kV, et le spectre EDX avec un voltage de 5 kV.





**Fig. 3-14 : Silicification à 60°C :** Micrographies MEB montrant des cellules de *Rhodovulum sp.*, exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice à 500 ppm pendant différentes durées, à 60°C. **(a)** Un jour : cellules (C) déformées et piégées dans le précipité de silice (Si) qui inclut également des EPS (EPS), avec le spectre EDX correspondant **(c)** obtenu sur l'ensemble du précipité. Noter l'espace vide autour des cellules. Noter les pics du sodium (Na) et du magnésium (Mg). Le spectre EDX **(d)** a été obtenu sur des cellules isolées. **(b)** Un jour : vue rapprochée sur les EPS (EPS). Noter les particules de silice qui ont précipité sur les EPS. **(e)** Un mois : cellules (C) déformées et piégées dans le précipité de silice (Si), avec le spectre EDX correspondant **(g)** obtenu sur l'ensemble du précipité. Noter la présence d'EPS ou des restes cellulaires dans le précipité (flèche). Noter le pic du magnésium (Mg). **(f)** Cellules isolées déformées (C) avec le spectre EDX correspondant **(h)**. Noter les particules de silice (flèche) précipitées sur la paroi des cellules. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV.



Après 9 mois de fossilisation, les cellules de *Rhodovulum sp.* montrent de nets signes de déformation (Fig. 3-13c et 3-13d). Elles sont parfois piégées dans la matrice de silice. La microscopie optique montre qu'à ce stade, la plupart des cellules étaient effectivement mortes. Les particules de silice, d'environ 50 nm, ont crû. Les analyses faites sur ce précipité montrent un signal du silicium (Si), mais pas de sodium ni de magnésium (Fig. 3-13e). Le pic du carbone (C) provient du filtre Millipore qui sert de support. Certaines cellules montrent une légère précipitation de silice sur leur paroi (Fig. 3-13d, flèche).

Aucune structure pouvant être identifiée comme étant des EPS secrétés par les cellules n'a été observée au cours de cette fossilisation réalisée à température ambiante.

### 3.2.1.2. Silicification à 60°C

Après 24 heures de fossilisation à 60°C, le tableau était assez différent. Un dépôt granuleux, dense, et sans structure apparente s'est également formé (Fig. 3-14a), constitué de silice d'après les analyses EDX (Fig. 3-14c, pic du silicium). Il faut également noter la présence de sodium et de magnésium dans ce dépôt, le signal du carbone venant des composées organiques des cellules et des EPS, tous deux présents en abondance dans ce précipité. L'augmentation du pH était moins marquée que lors de la fossilisation à température ambiante (Tableau 3-VII).

Tableau 3-VII : Valeurs du pH au cours de la fossilisation expérimentale de *Rhodovulum sp.* à 60°C.

Temps d'exposition	Etat naturel	1 mois	1mois (témoin sans cellules)
<i>pH</i>	7,0	7,7	7,4

Les cellules observées apparaissent déformées (Fig. 3-14a) et liées entre elles par des EPS filamenteux qui n'ont pas été observés à l'état naturel. Ces cellules sont piégées dans la matrice de silice formée de particules de 20-30 nm, mais il n'y a pas d'indice d'une précipitation de silice sur la paroi des cellules. Des analyses EDX, obtenues sur des cellules en dehors du précipité, n'ont pas montré de signal du silicium (Fig. 3-14d). Il n'y a pas non plus de contact direct entre la matrice de silice et la paroi des cellules : un espace vide d'environ 100 nm entoure les cellules. Par endroits, les EPS forment des feuillets (localement

dissociés) qui recouvrent la matrice de silice et les cellules (Fig. 3-14b). Une fine granulation, probablement de nanoparticules de silice, est visible sur ces EPS.

Après un mois de fossilisation, le nombre de cellules encore présentes a fortement baissé. Seules quelques cellules déformées sont visibles dans la matrice de silice (Fig. 3-14e). L'espace vide visible après 24 heures entre la paroi des cellules et la silice n'est plus présent : les cellules sont clairement associées avec les particules de silice, même si aucun signal du silicium n'a été détecté sur les analyses EDX faites sur des cellules isolées (Fig. 3-14h). Une granulation est parfois visible sur ces cellules (Fig. 3-14f, flèche). Le précipité de silice présente une nette structure alvéolaire, où l'on peut voir par endroit des EPS ou des restes cellulaires (Fig. 3-14e, flèche). Les particules de silice sont nettement plus grandes qu'au même stade lors de la fossilisation à température ambiante. En plus du silicium (Si), les analyses EDX obtenues sur le précipité de silice montrent toujours un signal du magnésium (Mg) (3-14g).

La couleur rouille des cultures et du précipité qui s'est formée au cours de la fossilisation est due au Fer III, produit du métabolisme des cellules de *Rhodovulum sp.* Aucun signal du fer n'a cependant été détecté sur les spectres EDX aux différents stades de la fossilisation, que ce soit à 60°C ou à température ambiante.

### **3.2.2 Silicification expérimentale de *Geobacillus sp.***

**Tableau 3-VIII : Silicification expérimentale de *Geobacillus sp.* à une concentration en silice de 500 ppm. Bilan des observations : images MEB et spectres présentés dans les figures.**

Temps d'exposition	Micrographies	Spectres EDX
<i>Etat naturel</i>	Fig. 3-15a/3-15b	-
<i>1 mois</i>	Fig. 3-15c /3-15d /3-15e	Fig. 3-15f/3-15g
<i>10 mois</i>	Fig. 3-16a/3-16b/3-16c	Fig. 3-16d/3-16e

Les cellules de *Geobacillus sp.* forment à l'état naturel des bâtonnets d'environ 0,5 µm de large, et de 3-4 µm de longueur. Les cellules observées au MEB étaient souvent déformées (Fig. 3-15a et 3-15b). Ceci est certainement la conséquence d'une culture trop longue et/ou de variations de température, notamment du fait du transport des cultures de Brest à Orléans.

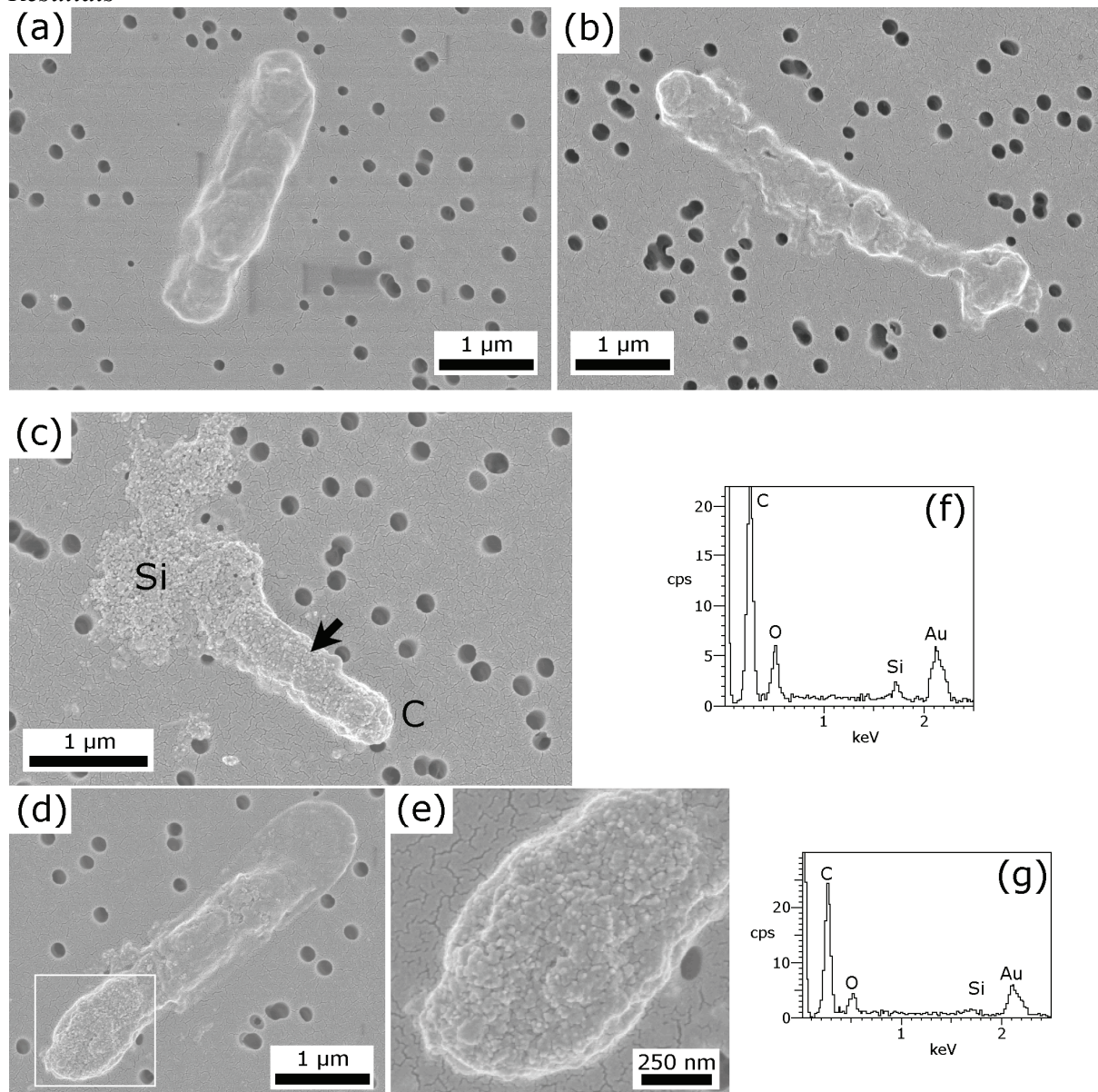
Aucune structure pouvant être interprétée comme des EPS sécrétés par les cellules n'a été observée sur les échantillons fossilisés ou non.

La densité cellulaire en fin de culture était assez élevée, ainsi les cellules ont été trouvées facilement lors de l'observation des échantillons au MEB. Après l'injection de la solution de silice, un précipité floconneux est apparu dans les cultures. Le pH du milieu est resté autour de 8 tout au long de la fossilisation expérimentale.

Après un mois de fossilisation expérimentale, les cellules ne montrent pas de signes d'un accroissement de la déformation (Fig. 3-15d). Un précipité dense et granuleux est présent sur les échantillons (Fig. 3-15c). Les pics du silicium et de l'oxygène présents sur les spectres EDX (Fig. 3-15f) montrent qu'il s'agit d'un précipité de silice. Ce précipité n'a pas de structure apparente. Des particules de silice ont également précipité sur la paroi des cellules (Fig. 3-15e), mais en quantité insuffisante pour qu'un signal du silicium soit présent sur les spectres EDX (Fig. 3-15g).

Les nombreuses cellules observées après 10 mois de fossilisation ne sont visiblement pas davantage déformées (Fig. 3-16b). En revanche, une quantité importante de granules de silice a précipité sur leur paroi (Fig. 3-16c). En raison de cette précipitation importante, les cellules piégées dans la matrice de silice sont difficilement repérables (Fig. 3-16a). L'importance de la précipitation de silice sur la paroi varie selon les cellules : certaines sont complètement recouvertes par les particules de silice (Fig. 3-16c), tandis que la paroi est encore visible sur d'autres (Fig. 3-16b). Malgré cette précipitation conséquente, les spectres EDX obtenus sur les cellules ne montrent pas de signal du silicium (Fig. 3-16e). Le pic du carbone (C) présent sur les analyses EDX faites sur le précipité de silice (Fig. 3-16d) montre que celui-ci contient une grande quantité de composés organiques (probablement des cellules piégées).

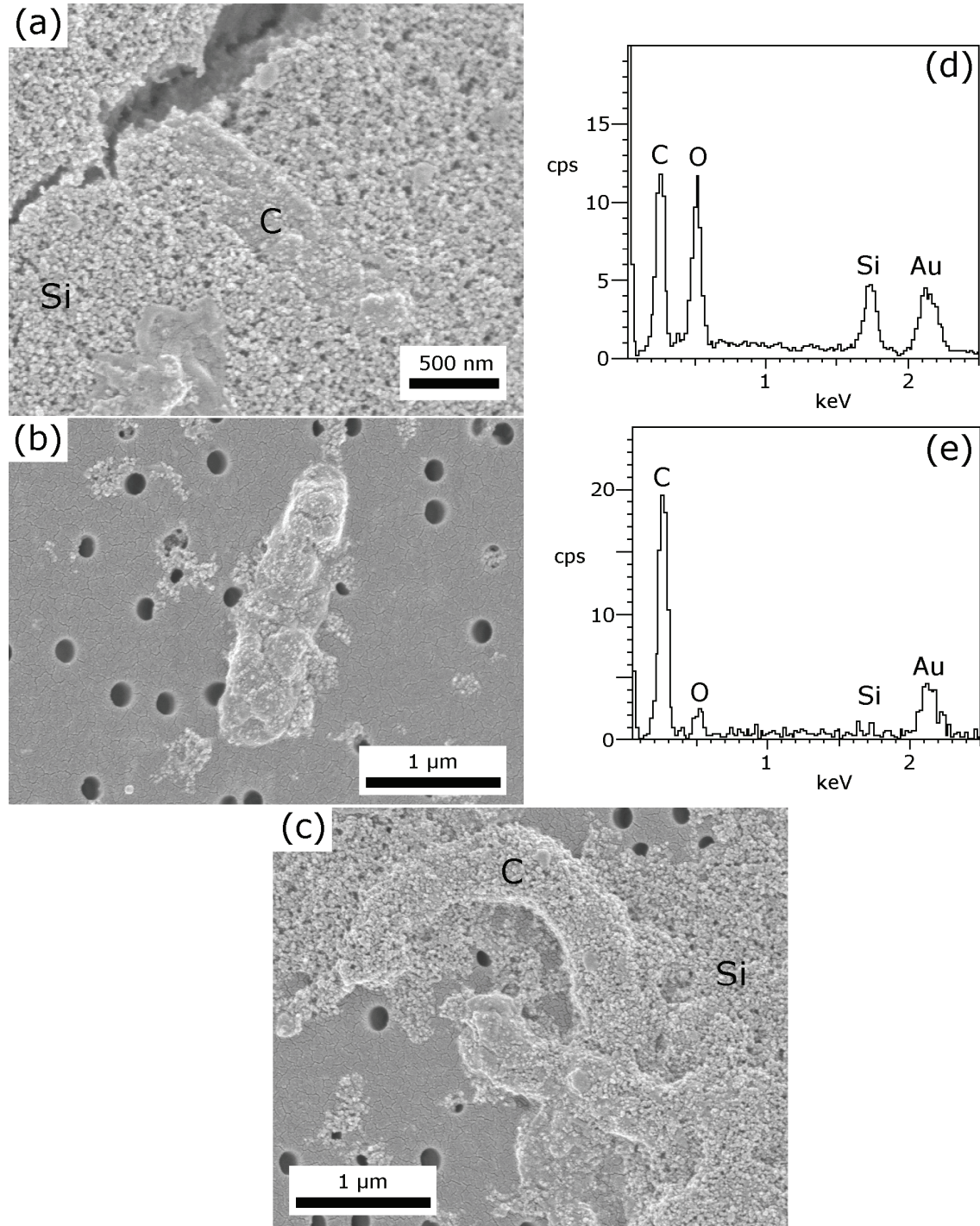
## Résultats



### Silicification de *Geobacillus sp.* à une concentration de silice de 500 ppm

**Fig. 3-15 : Etat naturel et 1 mois de fossilisation :** Micrographies MEB, avec les spectres EDX correspondants, montrant des cellules de *Geobacillus sp.* non fossilisées, et exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice à 500 ppm pendant 1 mois. **(a) (b)** Cellules non fossilisées. Noter l'aspect déformé des cellules, dû à des variations de conditions de culture. **(c)** 1 mois : cellule (C) avec le précipité de silice (Si), avec le spectre EDX correspondant **(f)** obtenu sur le précipité. Noter la précipitation de particules de silice sur la paroi de la cellule (flèche). **(d)** 1 mois : cellule isolée (C), avec le spectre EDX correspondant **(g)** obtenu sur la cellule. Un agrandissement est présenté en **(e)**. Noter la précipitation de particules de silice à la surface de la cellule. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV.





**Fig. 3-16 : 10 mois de fossilisation :** Micrographies MEB, avec les spectres EDX correspondants, montrant des cellules de *Geobacillus sp.*, exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice à 500 ppm pendant 10 mois. **(a)** Cellule (C) déformées et piégées dans le précipité de silice (Si), avec le spectre EDX correspondant **(d)** obtenu sur le l'ensemble du précipité. Noter la grande quantité de particules de silice précipitées sur la paroi de la cellule. **(b)** Cellule isolée, avec le spectre EDX correspondant (e) obtenu sur la cellule. Noter les particules de silice qui ont précipité sur la paroi des cellules. **(c)** Cellules (C) à proximité du précipité de silice (Si). Noter la grande quantité de particules de silice précipitées sur la paroi de la cellule. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV.

### 3.3. Variations du mode opératoire

Après le constat de l'absence de fossilisation des cellules de *M. jannaschii*, nous avons voulu tester le mode opératoire de Toporski *et al.* (2002) qui avait été validé par la silicification des Bactéries *Desulfovibrio indonensis* et *Pseudomonas fluorescens*, dans une solution de silicate de sodium pure à une concentration de 5000 ppm.

Enfin, en fossilisant les micro-organismes dans leur milieu de culture à une concentration en silice de 5000 ppm, nous voulions voir si l'augmentation de la quantité de silice, bien au-delà des concentrations naturelles, pouvait effectivement permettre la fossilisation.

#### **3.3.1. Fossilisation expérimentale de différents micro-organismes dans une solution de silice pure**

**Tableau 3-IX : Silicification expérimentale de différentes souches dans une solution de silice pure à une concentration de 5000 ppm. Bilan des observations : images MEB et spectres présentés dans les figures**

Temps d'exposition	<i>M. jannaschii</i>	<i>P. abyssi</i>	<i>Rhodovulum sp.</i>
24 heures	Fig. 3-17a	Fig. 3-17c	Fig. 3-17e
1 mois	Fig. 3-17b	Fig. 3-17d	-

Lors de cette étude, différentes souches ont été fossilisées expérimentalement en utilisant un mode opératoire différent de celui appliqué lors de la fossilisation expérimentale précédemment décrite. Les cellules ont été récupérées par filtration à la fin de la croissance et placées dans une solution pure de silicate de sodium à une concentration de silice à 5000 ppm et un pH ajusté à 8. Ce mode opératoire est adapté de celui utilisé par Toporski *et al.* (2002). Aucun précipité de silice visible à l'œil nu ne s'est formé dans les flacons au cours de l'incubation à 60°C ; la solution est restée limpide tout du long.

Sur l'ensemble des échantillons, les observations en microscopie électronique à balayage n'ont montré qu'un faible nombre de cellules. En effet, tout au long de cette fossilisation le support des cellules était un filtre Millipore ayant initialement servi à récupérer les cellules à la fin de la culture. Récupéré en fin de fossilisation, ce filtre était découpé pour être observé au MEB. Le séjour dans la solution de silice a sans aucun doute entraîné une

remise en suspension des bactéries, seule une faible partie d'entre elles restant sur le filtre. Ainsi, seules quelques images ont pu être obtenues pour chaque souche. Mais celles-ci apportent néanmoins des informations qui peuvent être utiles à la compréhension du phénomène de fossilisation.

### **3.3.1.1. Methanocaldococcus jannaschii**

Pour les raisons précitées, ajoutées au fait que la densité cellulaire de *M. jannaschii* en fin de croissance n'était pas très importante, très peu de cellules ont pu être observées sur les échantillons. Le filtre ne présentait pas de précipité important de silice associé aux EPS comme c'était le cas lors de la fossilisation menée à 500 ppm de silice dans le milieu de culture.

Après 24 heures de fossilisation, quelques cellules étaient cependant visibles. La Fig. 3-17a montre le reste d'une cellule lysée, qui s'est totalement vidée de son contenu. Une fine granulation, probablement de silice, est visible sur la paroi. Le filtre qui avait également été exposé à la solution saturée de silice montre un précipité similaire sur toute sa surface, à l'exception d'une petite zone autour de la cellule.

Aucune cellule n'a été clairement identifiée après un mois de silicification. La précipitation de silice sur le filtre et les structures présentes était plus marquée (Fig. 3-17b). Il n'est pas à exclure que les structures micrométriques observées soient des restes bactériens dont la paroi est entièrement recouverte de silice.

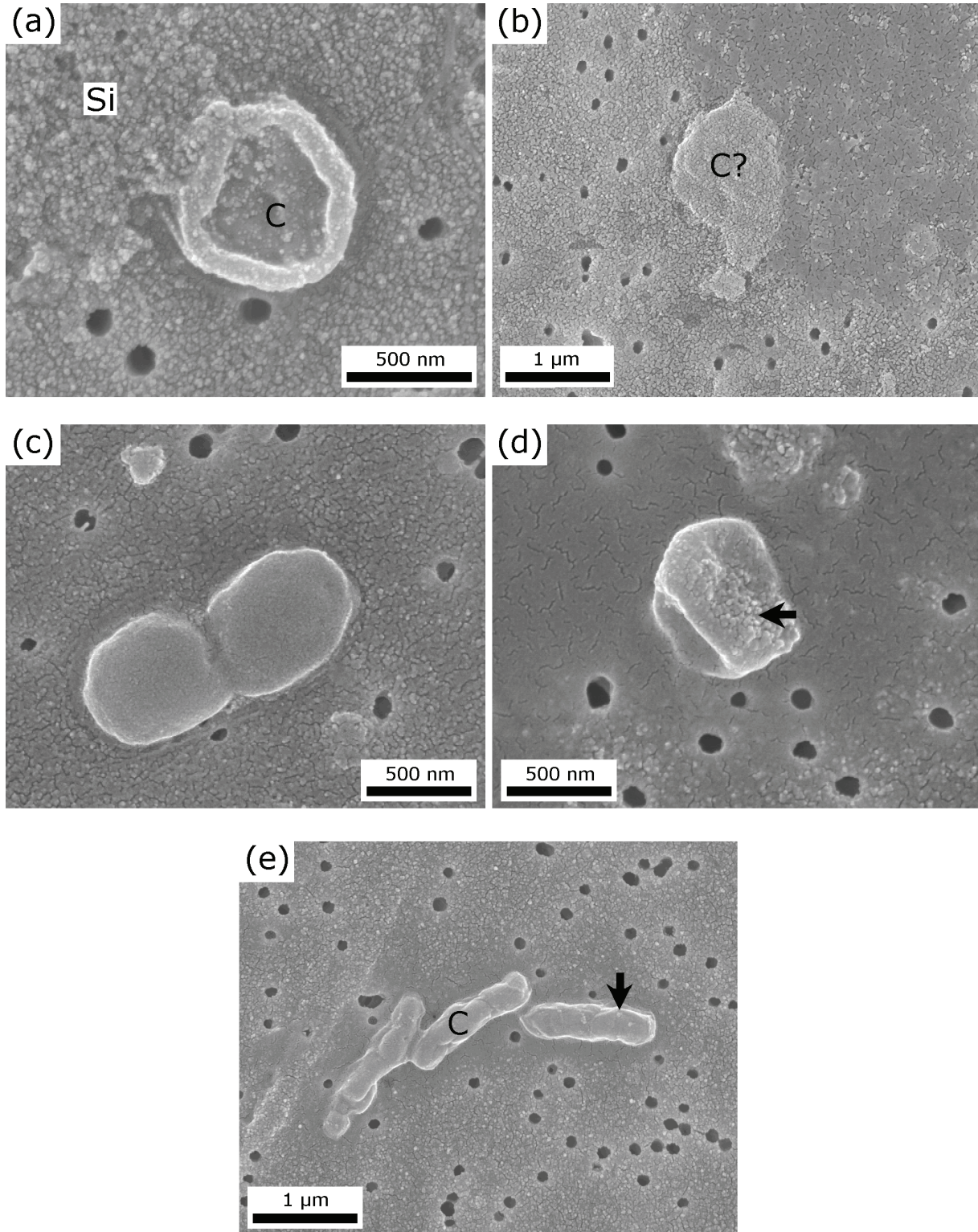
### **3.3.1.2. Pyrococcus abyssi**

Du fait de la plus grande densité cellulaire en fin de croissance, davantage de cellules de *P. abyssi* ont pu être observées sur les échantillons. Si des nanoparticules de silice ont effectivement précipité sur le filtre après 24 heures (Fig. 3-17c), ce n'était pas le cas sur les cellules. Les deux cellules présentes sur la Fig. 3-17c sont en division, et étaient donc probablement encore vivantes au moment du prélèvement.

Après 1 mois de fossilisation, les seules cellules visibles (Fig. 3-17d) étaient déformées, lysées, et donc mortes, avec une grande quantité de particules de silice précipitées à leur surface. A noter encore une fois, l'accroissement du précipité de silice sur le filtre, à l'exception d'une zone entourant les cellules.



## Résultats



### Silicification de différentes souches dans une solution de silice pure à une concentration de 5000 ppm

**Fig. 3-17 :** Micrographies MEB, montrant des cellules de *Methanocaldococcus jannaschii*, *Pyrococcus abyssi*, et *Rhodovulum sp.*, exposées à une solution de silice pure à 5000 ppm pendant différentes durées. **(a)** Cellule lysée de *M. jannaschii* (C), exposée pendant 24 heures. Des particules de silice (Si) ont précipité sur la paroi de la cellule et sur le filtre. **(b)** Structure micrométrique, qui est peut-être une cellule lysée de *M. jannaschii* (C?), sur un échantillon exposé pendant un mois. Des particules de silice ont précipité sur cette structure et sur le filtre. **(c)** Cellules en division de *P. abyssi*, exposées pendant 24 heures. Des particules de silice ont précipité sur le filtre. Noter les fines particules de silice qui ont précipité sur la paroi des cellules (flèches). **(d)** Cellule lysée de *P. abyssi*, exposée pendant un mois. Des particules de silice ont précipité sur la paroi de la cellule (flèche) et sur le filtre. **(e)** Cellules lysées (C) de *Rhodovulum sp.*, exposées pendant 24 heures à 60°C. Des particules de silice ont précipité sur le filtre. Noter les fines particules de silice qui ont précipité sur la paroi des cellules (flèche). Toutes les micrographies MEB ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV.



### 3.3.1.3. Rhodovulum sp.

Comme lors de la fossilisation avec 500 ppm de silice dans le milieu de culture à 60°C, les cellules de *Rhodovulum sp.* montrent déjà des signes de déformations après 24 heures de fossilisation dans ces nouvelles conditions. Ici encore, la silice a précipité sur le filtre, sauf à proximité immédiate des cellules et quelques particules de silice sont déjà présentes sur la paroi des cellules (Fig. 3-17e).

### **3.3.2. Fossilisation expérimentale à une concentration de silice de 5000 ppm**

*M. jannaschii* et *P. abyssi* ont également été utilisées pour une autre fossilisation expérimentale réalisée dans le milieu de culture, mais cette fois avec une concentration en silice de 5000 ppm.

**Tableau 3-X : Silicification expérimentale de différentes souches à une concentration de silice de 5000 ppm. Bilan des observations : images MEB et spectres présentés dans les figures.**

Temps d'exposition	<i>M. jannaschii</i>		<i>P. abyssi</i>	
	Micrographies	Spectres EDX	Micrographies	Spectres EDX
<b>24 heures</b>	Fig. 3-18a/3-18b	Fig. 3-18c /3-18d	-	-
<b>2 mois</b>	Fig. 3-18e / 3-18f/3-18g	Fig. 3-18h	-	-
<b>9 mois</b>	-	-	Fig. 3-19a/3-19b	Fig. 3-19c/3-19d

#### 3.3.2.1. Methanocaldococcus jannaschii

Comme lors de la fossilisation expérimentale réalisée en présence de 500 ppm de silice, un précipité blanc et floconneux s'est formé en quelques heures après l'injection de la solution de silicate de sodium dans les flacons de culture. En conséquence normale d'une concentration en silice plus élevée, ce précipité de silice était plus important, tout comme l'était la hausse du pH après injection (de 6,5 à 9,3).

Observé au microscope électronique à balayage (MEB) 24 heures après l'injection de la silice, l'échantillon présente une grande abondance de précipités granuleux de structure alvéolaire (Fig. 3-18a) et de nature siliceuse, d'après les analyses EDX (Fig. 3-18c). Ce précipité semble beaucoup plus dense que celui observé à 500 ppm (comparer les Figs. 3-18a et 3-8a). Les spectres EDX réalisés sur les dépôts de silice montrent également un signal du carbone (C) qui témoigne de la présence de matière organique (EPS) dans le précipité, ainsi que des signaux du sodium et du magnésium. Le signal du magnésium (Mg) avait déjà été observé lors de la fossilisation à 500 ppm. La Fig. 3-18b montre une cellule déjà lysée après 24 heures de silicification. Une légère granulation est visible sur la paroi (flèche). L'analyse EDX faite sur cette cellule (Fig. 3-18d) montre un léger signal du silicium (Si)

Après deux mois de silicification, le précipité de silice présente toujours cet aspect dense, granuleux, avec une structure alvéolaire (Fig. 3-18e). Les analyses EDX sur ce précipité (Fig. 3-18h) montrent un fort signal du silicium. Le signal du magnésium est toujours présent. A l'intérieur de ce précipité, des formes lisses sont visibles (Fig. 3-18f, flèche) ; elles ont été interprétées comme des EPS ou des restes cellulaires. Des formes pouvant être des restes cellulaires ont également été observées en dehors des précipités, de façon ponctuelle (Fig. 3-18g), mais il n'y avait de cellules clairement identifiables.

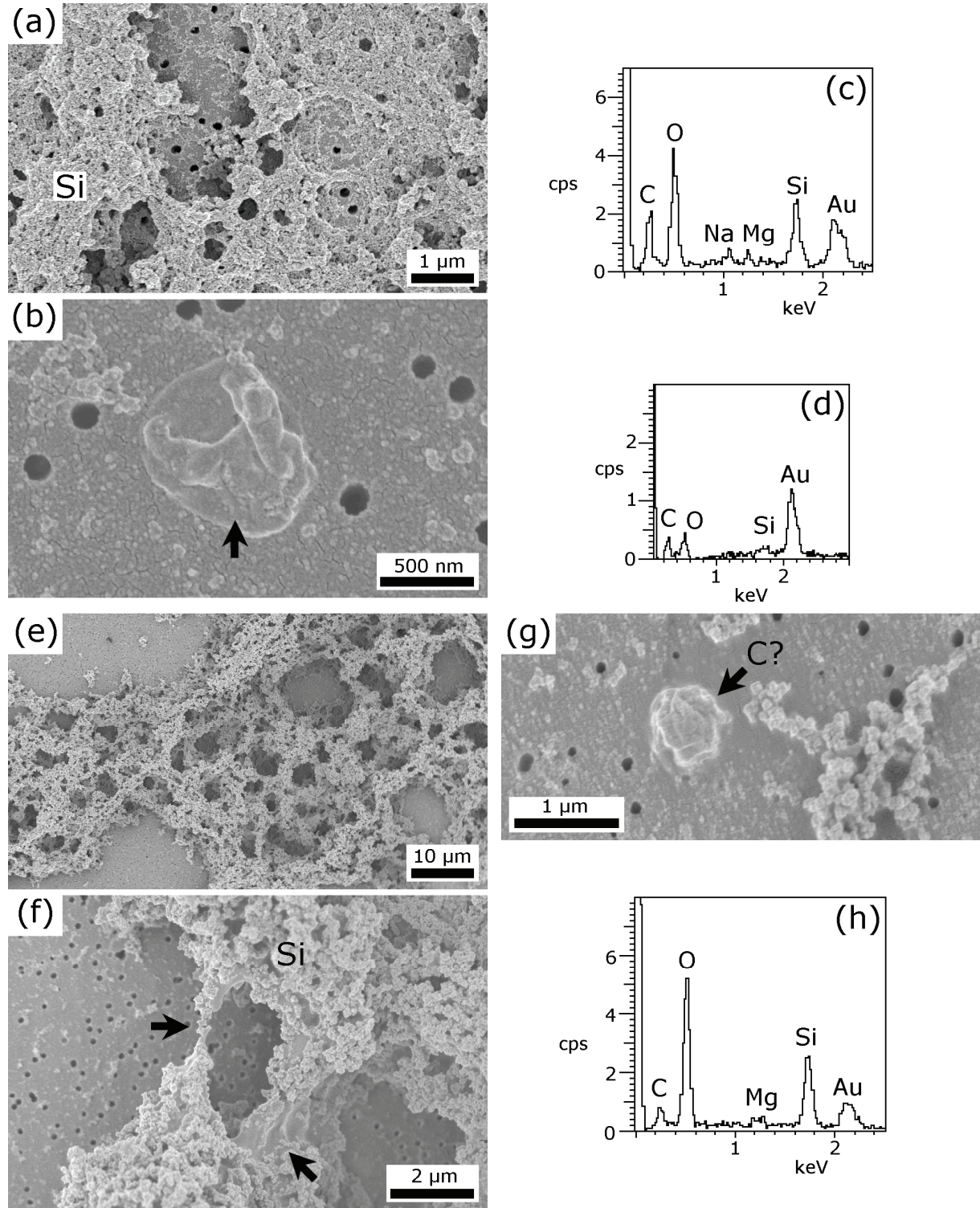
### 3.3.2.2. *Pyrococcus abyssi*

Un important précipité blanc et floconneux de silice s'est également formé dans les flacons de culture de *P. abyssi* après l'injection de la silice. Comme lors de la fossilisation à une concentration en silice de 500 ppm, et par comparaison avec ce que l'on a observé pour *M. jannaschii*, la hausse du pH consécutive à l'injection de la silice n'était pas très marquée (de 7,0 à 8,3).

Ce précipité était visible sur les images MEB prises après 9 mois de fossilisation expérimentale, et présentait le même aspect que celui observé au même stade lors de la fossilisation à 500 ppm (Fig. 3-19a). Ce précipité, formé de particules nanométriques de silice, ne montre pas de structure apparente. Ces particules sont de la même taille que celles présentes au même stade lors de la fossilisation à 500 ppm (comparer les Figs. 3-19a et 3-4a). Les spectres EDX de ces dépôts confirment leur nature siliceuse (Fig. 3-19c, pics du silicium et de l'oxygène).

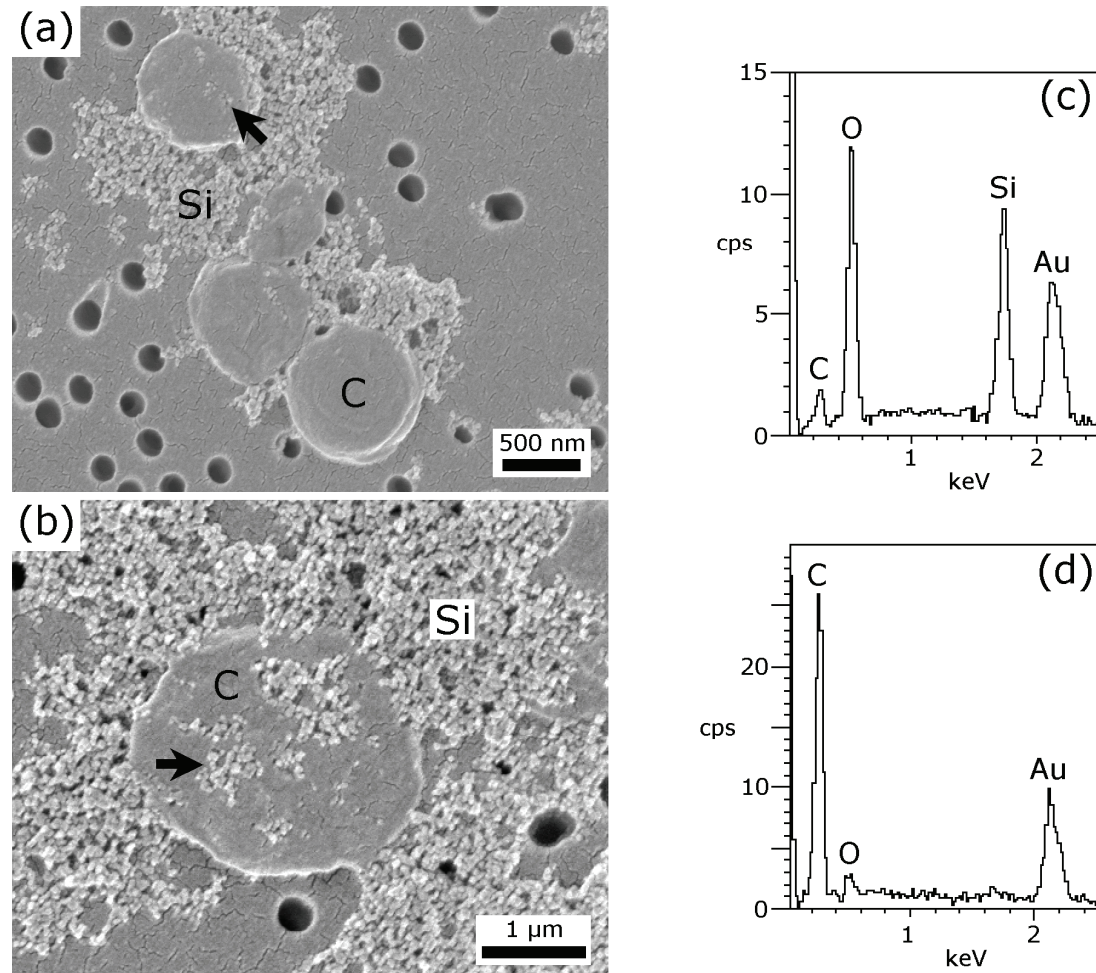
Un grand nombre de cellules de *P. abyssi* est encore visible, essentiellement en dehors du précipité de silice. Elles montrent de nets signes de déformation (Figs. 3-19a et 3-19b). En

## Résultats



### Silicification de différentes souches à une concentration de silice de 5000 ppm

**Fig. 3-18 :** *Methanocaldococcus jannaschii* : Micrographies MEB, avec les spectres EDX correspondants, montrant des cellules de *M. jannaschii* exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice à 5000 ppm pendant différentes durées. **(a)** 24 heures : noter la structure alvéolaire du précipité de silice (Si). Le spectre EDX **(c)** a été obtenu sur l'ensemble du précipité. Noter le pic du magnésium (Mg) et de sodium (Na) sur le spectre. **(b)** 24 heures : cellule lysée, avec le spectre EDX correspondant **(d)** obtenu sur la cellule. Noter la précipitation de particules de silice sur la paroi de la cellule (flèche). **(e)** Deux mois : noter la structure alvéolaire du précipité de silice. Le spectre EDX **(g)** a été obtenu sur l'ensemble du précipité. Noter le pic du magnésium (Mg) sur le spectre. **(f)** Deux mois : précipitation de silice (Si) sur les EPS et/ou restes cellulaires (flèches). **(g)** Deux mois : structure micrométrique, qui est peut-être une cellule lysée de *M. jannaschii* (C?). Toutes les micrographies MEB ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV.



**Fig. 3-19 :** *Pyrococcus abyssi* : Micrographies MEB, avec les spectres EDX correspondants, montrant des cellules de *P. abyssi* exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice à 5000 ppm pendant neuf mois. **(a)** Cellules (C) au sein du précipité de silice (Si) avec le spectre EDX correspondant **(c)** obtenu sur le précipité ; des particules de silice qui ont précipité sur la paroi cellulaire sont visibles (flèche). **(b)** Cellule isolée (C) au sein du précipité de silice (Si) avec le spectre EDX correspondant **(d)** obtenu sur la cellule ; des particules de silice qui ont précipité sur la paroi cellulaire sont visibles (flèche). Toutes les micrographies MEB ont été obtenues à un voltage de 2kV, et les spectres EDX avec un voltage de 5 kV.

## *Résultats*

microscopie optique, aucune cellule ne semblait encore vivante. Des particules de silice sont parfois vues sur la paroi de ces cellules (Fig. 3-19b, flèche), même si cette minéralisation ne semble pas particulièrement importante en comparaison de celle observée après 9 mois de fossilisation à une concentration en silice de 500 ppm (comparer Fig. 3-19a et 3-4a). Les spectres EDX réalisés sur les cellules ne montrent aucun signal de silicium (Fig. 3-19d).

Le Tableau 3-XI regroupe les résultats de toutes les fossilisations expérimentales.

Tableau XI : Bilan des résultats finaux des fossilisations expérimentales d'Archées et de Bactéries.

	CONDITIONS EXPERIMENTALES			RESULTAT FINAL		SILICIFICATION		
	Milieu de silicification	T°C [SiO <sub>2</sub> ]	Durée maximale observée	Cellules	EPS	Cellules	EPS	Degré de fossilisation
<b><i>Methanocaldococcus jannaschii</i></b> (Archée méthanogène)	Milieu de culture originel	60°C 500 ppm	1 an	Lyse	Préservation	Aucune	Oui	Nul
		60°C 5000 ppm	2 mois	Lyse	n.d.	Nanoparticules sur la paroi	-	Faible sur les restes cellulaires
	Solution de silice pure	60°C 5000 ppm	1 mois	Lyse	-	Nanoparticules sur la paroi	-	Léger sur les restes cellulaires
<b><i>Pyrococcus abyssi</i></b> (Archée hyperthermophile)	Milieu de culture originel	60°C 500 ppm	1 an	Préservation Déformation	Pas d'EPS	Nanoparticules sur la paroi, et dans le cytoplasme	-	Léger
		60°C 5000 ppm	9 mois	Préservation Déformation faible	Pas d'EPS	Nanoparticules sur la paroi	-	Léger
	Solution de silice pure	60°C 5000 ppm	1 mois	Préservation Déformation importante	-	Nanoparticules sur la paroi	-	Relativement important
<b><i>Rhodovulum sp.</i></b> (Bactérie Gram -, non thermophile)	Milieu de culture originel	20-25°C 500 ppm	9 mois	Préservation Déformation	Pas de préservation	Quelques nanoparticules sur la paroi	Non	Léger
		60°C 500 ppm	1 mois	Lyse de la majorité Forte déformation des cellules restantes	Préservation	Quelques nanoparticules sur la paroi	Non	Faible sur les cellules restantes
	Solution de silice pure	60°C 5000 ppm	24 heures	Lyse de la majorité Forte déformation des cellules restantes	-	Quelques nanoparticules sur la paroi	-	Faible sur les cellules restantes
<b><i>Geobacillus sp.</i></b> (Bactérie Gram +, thermophile)	Milieu de culture originel	60°C 500 ppm	10 mois	Préservation Cellules mortes ou moribondes initialement	Pas d'EPS	Nanoparticules recouvrant entièrement la paroi	-	Important



### 3.4. Adsorption et fixation d'ions métalliques par *M. jannaschii*

Différentes études ont montré qu'une fixation de cations fer sur les parois de Bactéries peut favoriser la fixation de silice (Ferris *et al.*, 1988 ; Fein *et al.*, 2002), en inhibant les enzymes autolytiques ou en servant d'intermédiaire entre les groupes fonctionnels de la paroi et les polymères de silice.

Les résultats de la fossilisation de *M. jannaschii* ayant montré une absence de fossilisation et une lyse des cellules, cette étude était donc d'abord destinée à vérifier que la paroi d'une Archée pouvait fixer des cations métalliques en solution, pour ensuite voir si la présence de fer pouvait avoir une influence ou non, sur le déroulement de la fossilisation et la préservation des cellules.

#### **3.4.1. Mesure de l'immobilisation de métaux par les micro-organismes par spectrométrie à absorption atomique**

Le tableau suivant regroupe les concentrations mesurées dans les différents échantillons après une heure d'incubation à 60°C dans différentes solutions d'ions métalliques employées.

**Tableau 3-XII : Concentrations en ions métalliques après incubation (1h, 60°C) en présence ou absence de micro-organismes, mesurée par spectrométrie d'absorption atomique.**

Metal	Fer III (Fe <sup>3+</sup> )	Calcium (Ca <sup>2+</sup> )	Zinc (Zn <sup>2+</sup> )	Cuivre (Cu <sup>2+</sup> )	Plomb (Pb <sup>3+</sup> )
<i>[ ] sans bactéries (mM)</i>	14,076	12,655	10,106	10,054	10,135
<i>[ ] avec bactéries (mM)</i>	9,665	12,575	10,014	9,692	9,924
<i>Différence (mM)</i>	4,441	0,080	0,092	0,362	0,211
<i>Différence (%)</i>	31,6	0,63	0,91	3,6	2,08

Le tableau suivant compile quant à lui les mesures des pH finaux des différents échantillons, après une heure d'incubation à 60°C.

**Tableau 3-XIII : pH des solutions d'ions métalliques après incubation (1h, 60°C) en présence ou absence de micro-organismes.**

Metal	Fer III (Fe <sup>3+</sup> )	Calcium (Ca <sup>2+</sup> )	Zinc (Zn <sup>2+</sup> )	Cuivre (Cu <sup>2+</sup> )	Plomb (Pb <sup>3+</sup> )
<i>pH de la solution de base</i>	2,26	6,70	5,73	4,75	4,30
<i>pH final, sans bactéries</i>	1,84	6,71	5,22	4,28	4,17
<i>pH final, avec bactéries</i>	1,98	6,76	5,35	4,30	4,44

Pour chaque sel métallique, c'est la même solution de base qui a été utilisée pour les échantillons « avec bactéries » et « sans bactéries », ce qui garantit une concentration initiale identique. La comparaison entre les deux mesures (avec et sans bactéries), permet de déterminer l'influence des bactéries seules sur la concentration en métaux, en faisant abstraction des autres facteurs pouvant aussi intervenir (milieu de culture, verrerie, température).

Les différences de concentrations entre les échantillons avec et sans bactéries montrent que dans tous les cas, les cellules de *M. jannaschii* ont une influence sur la concentration des différents ions. Cette influence peut se faire sous la forme d'une précipitation des ions, d'une adsorption, voire de leur fixation sur la paroi. Toutefois, les écarts varient en fonction des métaux. Ainsi la plus grande variation est observée pour les ions de Fer III (31,6 %). Cependant, lors de l'incubation à 60°C, un précipité de Fer III s'est formé dans les échantillons. Cette précipitation abiotique a probablement contribué au fort écart observé. Il ne s'est pas produit de précipitation similaire pour les autres échantillons, et les écarts de concentrations sont compris entre 0,63 et 3,6 %.

Finalement, on obtient la hiérarchie suivante des écarts de concentration en métal :

(forte différence de concentration) **Fe** >> **Cu** > **Pb** > **Zn** > **Ca** (faible différence)

L'incubation à 60°C pendant une heure a également entraîné de légères variations du pH, inférieure à 0,5 unités pH. De manière générale, les variations étaient moins importantes en présence de cellules.

### **3.4.2. Observations en microscopie électronique en transmission (MET)**

Si ces mesures ont montré que la présence de cellules de *M. jannaschii* a entraîné une baisse de la concentration en ions métalliques, elles ne renseignent pas sur les mécanismes mis en jeu dans ces baisses.



**Tableau 3-XIV : Fixation d'ions métalliques par *M. jannaschii*. Bilan des échantillons : images MET présentées dans les figures.**

Métal Testé	MET
<i>Etat naturel</i>	Fig. 3-20a
<i>Fer</i>	Figs. 3-20b/3-20c
<i>Plomb</i>	Fig. 3-20d
<i>Calcium</i>	Figs. 3-21a /3-21b/3-21c
<i>Cuivre</i>	Figs. 3-21d/3-21e/3-21f
<i>Zinc</i>	Fig. 3-21g/3-21h

Des coupes ultra-fines des cellules de *M. jannaschii* ayant été mises en contact avec des solutions d'ions métalliques ont été observées en microscopie électronique en transmission. Les coupes n'ont pas été contrastées. Le but des observations était ainsi de mettre en évidence une fixation / absorption / incorporation des ions métalliques par les structures cellulaires (paroi, cytoplasme, EPS) en observant le contraste que ces ions produisent en interceptant le faisceau d'électrons.

La Fig. 3-20a montre une cellule de *M. jannaschii* observée sur une coupe non contrastée, et sans exposition préalable à une solution d'ions métalliques. Du fait de l'absence de contraste, le contour de la cellule et ses structures sont difficilement repérables. Le cytoplasme montre un contraste légèrement plus marqué que la résine environnante, tandis que les membranes apparaissent plus claires que cette résine. Au vu de l'aspect de cette cellule, et en considérant le faible nombre de cellules obtenues en fin de culture, on comprend aisément que la principale difficulté de l'observation des échantillons était de repérer les cellules au sein des coupes, et aussi de les distinguer sans ambiguïté des artefacts présents sur les coupes. Dans certains cas, cette ambiguïté n'a pas pu être levée, même après coloration des sections ultrafines.

#### **3.4.2.1. Fixation de Fer**

Les cellules ayant été exposées à une solution de Fer III ressortaient nettement, certaines structures ayant été soulignées (Fig. 3-20b). Une large zone, comprenant la paroi et la partie externe du cytoplasme, apparaissait foncée. La paroi était même nettement visible en certains endroits (flèche). La cellule apparaît entourée d'une zone plus claire que la résine et d'environ 100 nm d'épaisseur, qui pourrait correspondre aux EPS entourant la cellule. Enfin

autour et à l'intérieur de la cellule, on trouve des petites particules noires. Le fait qu'elles soient agglomérées autour de la cellule nous permet d'éliminer l'hypothèse d'artefacts ou de salissures présentes sur la grille, comme on peut en observer parfois sur les grilles contrastées.

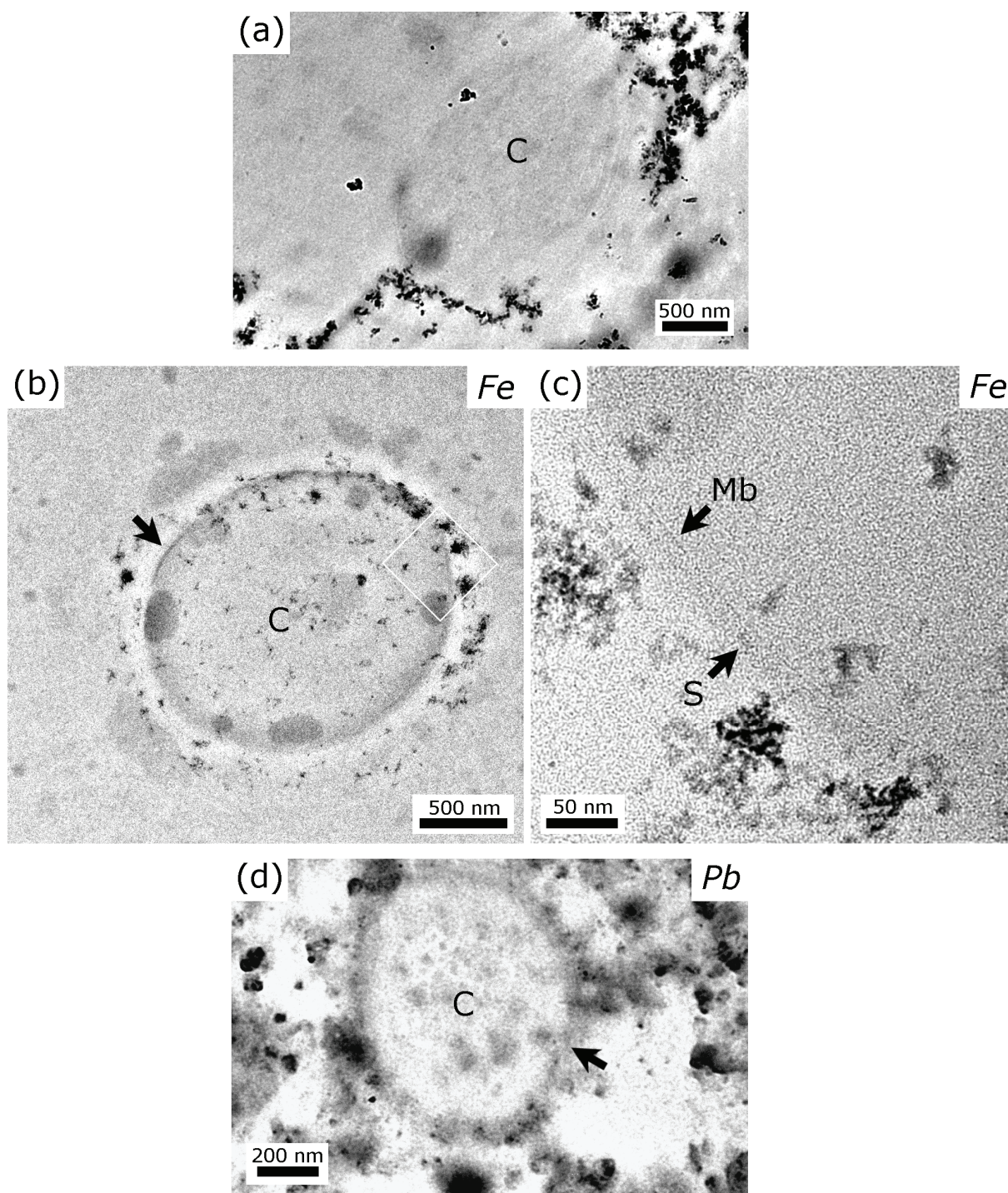
Sur une vue rapprochée sur la paroi (Fig. 3-20c), ce qui semble être la membrane cytoplasmique apparaît nettement contrasté, tandis que le reste de la paroi n'est pas davantage marqué que le cytoplasme, à l'exception d'une couche sombre, située à 10 nm environ de la membrane (flèche) et identifiée comme étant la S-Layer, qui semble être contrastée de manière discontinue. Les analyses EDX faites sur l'ensemble de cette cellule n'ont pas montré de signal du fer, celui-ci étant certainement présent en quantités trop faibles pour pouvoir être détectées.

### **3.4.2.2. Fixation de Plomb**

Les cellules ayant été plongées dans une solution de plomb (Fig. 3-20d) présentaient au MET un aspect assez similaire à ce que l'on peut voir sur les coupes contrastées. Cela n'a rien de surprenant quand on sait que le plomb est utilisé, avec l'uranium, comme « colorant » des coupes ultra-fines.

La cellule visible sur la Fig. 3-20d est au cœur d'un dépôt, présentant des particules sombres de tailles diverses. La nature de ce dépôt n'a pas pu être déterminée, mais il pourrait s'agir d'EPS ayant fixé des particules de plomb. La paroi de la cellule apparaît nettement contrastée. La coloration est assez diffuse. Au sein de cette paroi, il est possible voir plusieurs liserés (flèche), sur plusieurs épaisseurs, qui peuvent être interprétés comme étant la membrane cytoplasmique, et les contours de la S-Layer. Le cytoplasme a également été contrasté, bien que dans une moindre mesure. Il est possible de voir la granulation et les hétérogénéités de la substance cytoplasmique. Ici encore, les analyses EDX n'ont pas montré de signal du plomb.

En ce qui concerne les trois échantillons suivants, la nature cellulaire des structures observées n'a pas pu être formellement établie. Ces formes rondes, de taille micrométrique et qui présentent parfois un liseré externe, pourraient tout aussi bien être des artefacts, présents en grand nombre sur ces coupes non contrastées.

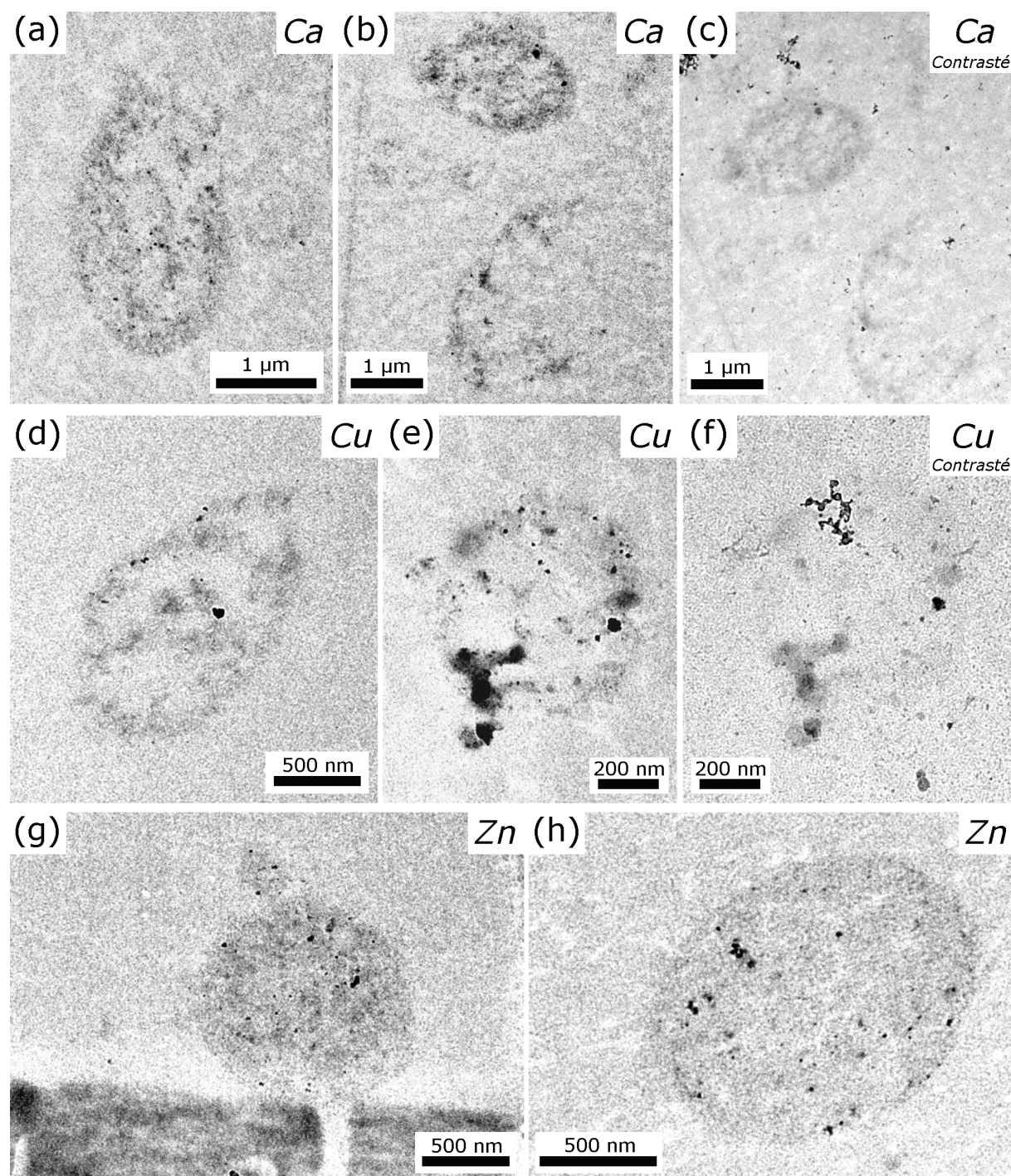


#### Fixation de métaux sur la paroi de *M. jannaschii*.

**Fig. 3-20 :** Micrographies MET, obtenues sur des coupes non contrastées, montrant des cellules de *Methanocaldococcus jannaschii* ayant été exposées à des solutions de différents ions métalliques à 10 mM (1 heure, 60°C). **(a)** Cellule (C), non exposée à une solution de sels métalliques, montrant l'aspect sans aucun contraste. Micrographie obtenue sur une coupe de l'échantillon fossilisé dans une solution de silice à une concentration de 500 ppm pendant 24 heures (les particules sombres sont le précipité de silice).

**(b)** Cellule exposée à une solution de Fer III ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Noter le contraste de la paroi (flèche), et présence d'un grand nombre de particules sombres autour et à l'intérieur de la cellule. **(c)** Vue rapprochée de la paroi cellulaire, montrant le contraste de la membrane plasmique et de cette dernière. **(d)** Cellule (C) exposée à une solution de Plomb ( $\text{Pb}^{2+}$ ), à l'intérieur d'un dépôt sombre non identifié. Noter le contraste de la paroi (flèche), et les granulations dans le cytoplasme.





**Fig. 3-21** : Micrographies MET, obtenues sur des coupes non contrastées (sauf mention contraire), préparées à partir de cultures de *Methanocaldococcus jannaschii* ayant été exposées à des solutions de différents ions métalliques à 10 mM (1 heure, 60°C). (a) (b) (c) Structures micrométriques, dans l'échantillon exposé à une solution de Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). (b) et (c) montrent la même structure, avant et après coloration de la coupe. (d) (e) (f) Structures micrométriques, dans l'échantillon exposé à une solution de Cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). (b) et (c) montrent la même structure, avant et après coloration de la coupe. (g) (h) Structures micrométriques, dans l'échantillon exposé à une solution de Zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ). La nature cellulaire de toutes ces structures observées est incertaine. Toutes les micrographies MET ont été obtenues à un voltage de 200 kV.

#### **3.4.2.3. Fixation de Calcium**

Les Figures 3-21a et 3-21b (en haut) montrent des structures ovoïdes ressemblant à des cellules, vues dans l'échantillon ayant été exposé pendant 1 heure à une solution de calcium. L'intérieur de ces formes, qui pourrait correspondre au cytoplasme, présente un léger contraste permettant de voir des granulations et des hétérogénéités. Un liseré entourant les structures est discernable par endroits. Il est cependant nettement moins marqué que ne l'étaient les parois des cellules observées dans le cas d'une exposition au fer ou au plomb. Sur la Fig. 3-21b (en bas), une autre structure d'aspect similaire est visible à côté de la forme ovoïde. Il pourrait s'agir d'une cellule lysée dont il ne resterait que la paroi (toujours faiblement marquée), ainsi qu'une partie du contenu du cytoplasme.

#### **3.4.2.4. Fixation de Cuivre**

Pour l'échantillon où des cellules de *M. jannaschii* ont été exposées à une solution de cuivre, certaines des structures observées (Fig. 3-21e) présentaient sans équivoque un liseré les délimitant. Ce liseré peut être interprété comme étant une paroi cellulaire, et par conséquent la nature cellulaire de la structure observée sur les coupes minces est plus probable que dans les cas du calcium et du zinc. Si une « membrane » est visible, le reste de la paroi n'est que faiblement contrasté et l'intérieur de cette structure (le « cytoplasme »), n'est pas très marqué, hormis quelques granulations. Des structures similaires ont été observées ailleurs sur les coupes (Fig. 3-21d).

#### **3.4.2.5. Fixation de Zinc**

Dans le cas d'une culture de *M. jannaschii* exposée à une solution de zinc, les structures observées étaient similaires à celles vues dans le cas du calcium (Figs. 3-21g et 3-21h). Ici encore, si l'on suppose que ces formes sont bien des cellules, la paroi n'est que difficilement visible (indiscernable pour la Fig. 3-21g, soupçonnée pour la Fig. 3-21h). L'intérieur de ces structures (le supposé cytoplasme) est cependant plus nettement marqué que dans le cas du calcium.

Dans le cas du calcium et du cuivre, après une première observation, les coupes ont été à nouveau observées après coloration au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyle. Cette nouvelle observation devait permettre de lever le doute quant à la nature cellulaire des



structures observées. Dans les deux cas, toutefois, nous n'avons pas observé d'augmentation du contraste des structures précédemment observées (Fig. 3-21c et f).

### 3.4.2.6. Bilan

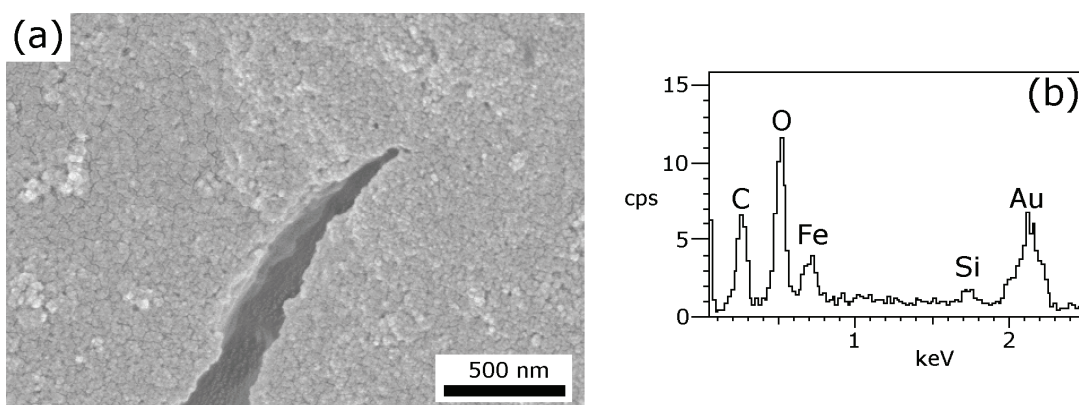
Ainsi, si l'on considère que l'ensemble des structures observées sont des cellules, on obtient la hiérarchie suivante, basée sur l'intensité du contraste observée :

(fort contraste) **Pb** > **Fe** > **Zn** > **Ca** > **Cu** (faible contraste)

Si l'on souhaite suivre une hypothèse prudente, il n'y a que dans les cas des échantillons Fer et Plomb, que les structures observées sont sans conteste des cellules. La hiérarchie est alors la suivante : **Pb** > **Fe**. Dans les deux cas, cet ordre est forcément subjectif, mais il est différent de celui déterminé par les mesures de spectrométrie par absorption atomique.

### 3.4.3. Fixation de fer suivie de silicification

Seules quelques observations ont pour l'instant été réalisées au MEB sur les cultures de *M. jannaschii* exposées à des ions Fer (III) puis à la silice. Après deux mois de silicification, les micrographies n'ont pas permis d'identifier des cellules ou leurs restes. Sur ces seules observations, il est toutefois prématuré de conclure à l'absence totale de cellules. Les importants dépôts visibles au MEB (Fig. 3-22a) ont en effet pu masquer les cellules.



**Fig. 3-22 :** Fixation de fer et deux mois de fossilisation : Micrographie MEB (a), avec le spectre EDX correspondant (b), montrant le précipité compact formé dans le milieu de culture de *M. jannaschii* après les injections d'une solution de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  à une concentration finale de 10 mM et, une heure après, d'une solution de silice à une concentration finale en silice de 500 ppm. Noter la présence des signaux du fer (Fe) et du silicium (Si) sur le spectre EDX. La micrographie a été obtenue à une voltage de 2kV, et le spectre EDX avec un voltage de 5 kV.

La seule structure visible était le précipité de silice qui montrait un aspect granuleux et très compact (Fig. 3-22a). Les analyses EDX montrent que ce précipité est un mélange de fer et de silice (Fig. 3-22b).

### **3.5. Fossilisation expérimentale des tapis microbiens d'Octopus Spring (Yellowstone)**

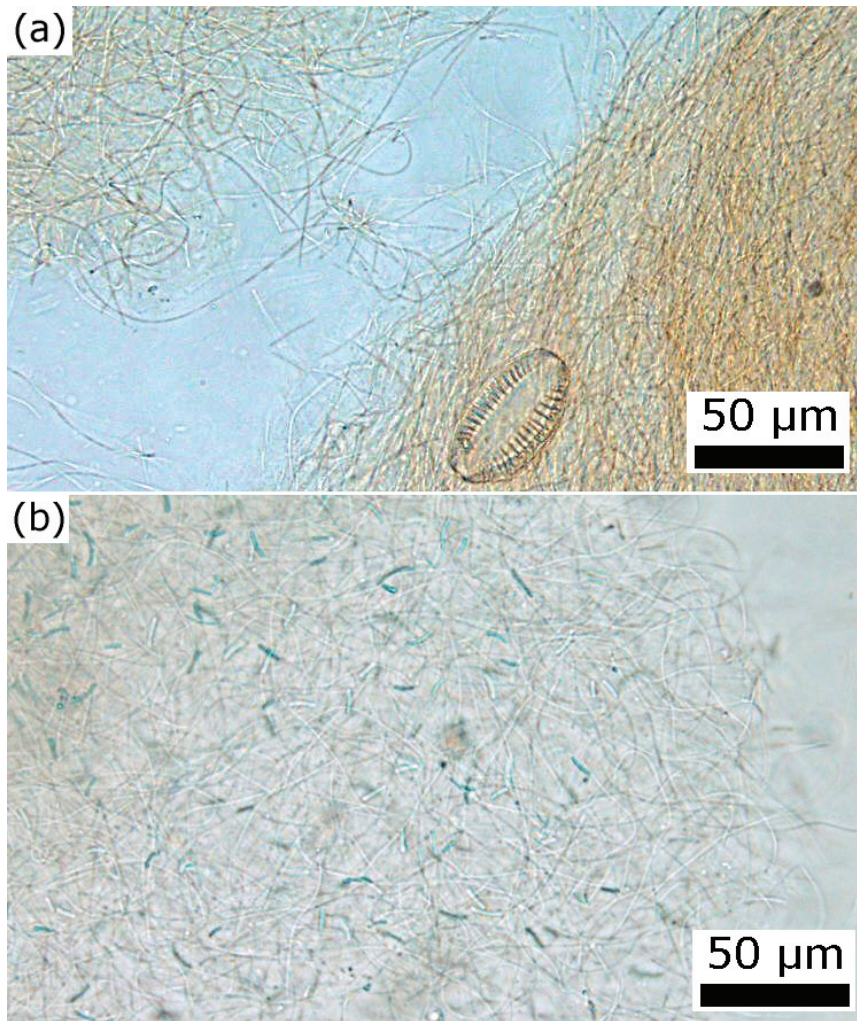
#### **3.5.1. Constatations générales et observations en microscopie optique des tapis bactériens**

Si les échantillons prélevés étaient encore dans leur disposition naturelle au début de la fossilisation (sous forme de carottes pour les prélèvements des sites n°1 et 2), le transport par courrier jusqu'en France les a presque en totalité dispersés et séparés en petites lamelles de tapis, correspondant aux laminations observées sur le terrain (Fig. 2-5)

Ainsi toute information sur l'organisation verticale du tapis a été perdue. Pour les prélèvements des sites n°1 et n°2, il était impossible de dire si un morceau de tapis à *Chloroflexus* (rouge) provenait d'une zone proche ou non de la surface. Ce problème ne s'est pas posé pour le prélèvement du site n°3, grâce à la faible épaisseur du tapis à *Chloroflexus* (quelques millimètres) et à la densité du tapis à cet endroit.

##### **3.5.1.1. Observation en microscopie optique**

Un premier état des lieux des tapis prélevés a été fait en microscopie optique. Cet examen a permis de se familiariser avec la diversité et la répartition des différentes espèces bactériennes, végétales ou animales présentes.



**Fig. 3-23 : Vues en microscopie électronique des tapis prélevés à Octopus Spring. (a) Tapis à *Chloroflexus* (filaments). La coloration rouge visible à l'œil nu est toujours présente. (b) Tapis à *Synechococcus* (bâtonnets verts). Noter la présence d'un grand nombre de filaments de *Chloroflexus*.**

Lors de ces observations, nous avons pu constater la prédominance, sinon l'omniprésence des faisceaux de filaments de *Chloroflexus* dans le tapis (Fig. 3-23a), y compris dans la couche verte de surface où l'on observe aussi un grand nombre de bâtonnets de *Synechococcus* verts (Fig. 3-23b). La seule différence notable constatée entre les différents sites était la nature beaucoup plus dense des mattes bactériennes du site n°3. La source et les tapis bactériens contiennent également des restes d'algues, d'espèces animales et végétales qui ont leur habitat dans la source ou aux alentours et qui sont tombés dedans (diatomées, grains de pollens, bisons).



### 3.5.1.2. Suivi des tapis au cours de la fossilisation

Au moment du prélèvement, les tapis présentaient une coloration très marquée sur toute leur épaisseur : vert foncé pour le tapis à *Synechococcus*, et rouge/rose pour le tapis à *Chloroflexus* (Fig. 2-5). Au fil de la silicification, les tapis bactériens les plus compacts (prélèvements au site n°3 ; tapis à *Synechococcus* et fragments du tapis à *Chloroflexus* pour les autres sites) ont conservé cette coloration, tandis que le reste des prélèvements devenait blanchâtre (Fig. 3-24).

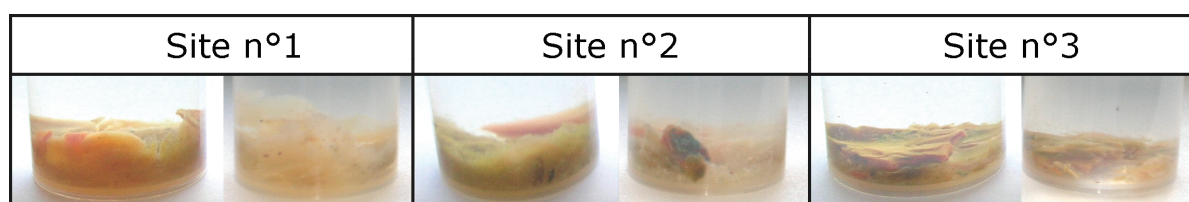


Fig. 3-24 : Aspect des tapis prélevés à Octopus Spring aux différents sites, immédiatement après le début de la silicification expérimentale (gauche), et après 5 mois de fossilisation (droite).

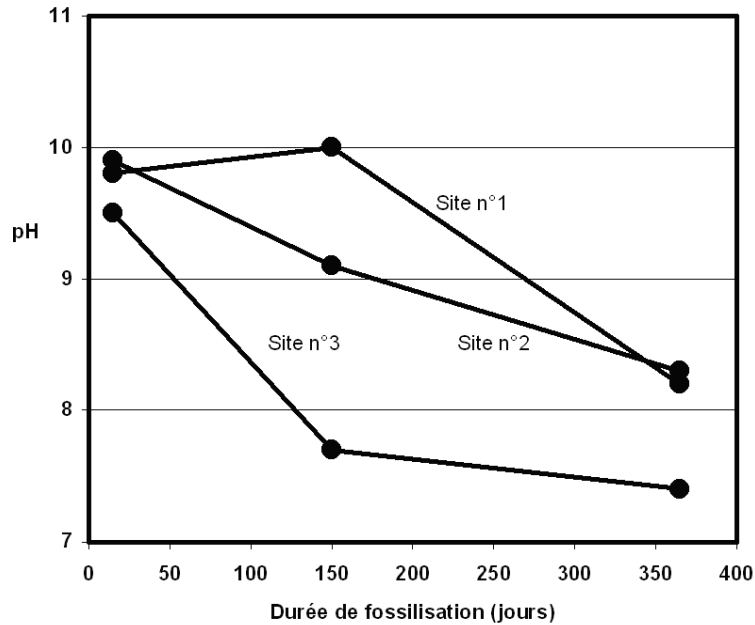
Cette perte de pigmentation a également été observée après un certain temps sur les échantillons fixés dans le glutaraldéhyde, et n'est probablement pas liée au processus de fossilisation.

### Mesure des pH des solutions de silice restantes

Le pH des solutions de silice a été mesuré après l'arrêt de la fossilisation.

Tableau 3-XV : Valeurs pH des solutions de silice au cours de la silicification expérimentale des tapis microbiens prélevés aux différents sites.

	15 jours	5 mois	1 an
<i>Site n°1</i>	9,8	10,0	8,2
<i>Site n°2</i>	9,9	9,1	8,3
<i>Site n°3</i>	9,5	7,7	7,4
<i>Eau distillée + silice 500 ppm</i>	10,0	10,4	10,1



**Fig. 3-25 : Evolutions des pH des solutions de silice au cours de la silicification expérimentale des tapis microbiens prélevés aux différents sites.**

Le pH de l'échantillon témoin (sans tapis microbien) ne s'est pas éloigné de 10 tandis que les pH des solutions de silice des échantillons en cours de fossilisation ont baissé progressivement, à des vitesses variables selon les sites. Ainsi pour le site n°3, une légère baisse pouvait déjà être notée après deux semaines de fossilisation. Cette baisse s'est ensuite poursuivie durant 5 mois de fossilisation puis le pH s'est stabilisé à une valeur proche de la neutralité. Les pH des milieux de fossilisation des prélèvements des autres sites (n°1 et 2) se sont également rapprochés de la neutralité, mais seulement après 1 an de fossilisation, après une lente baisse dans le cas du site n°2 et après être resté proche de la valeur initiale pendant au moins les 5 premiers mois de fossilisation dans le cas du site n°1 (Fig. 3-25).

Les tapis prélevés à Octopus Spring se divisent en deux catégories :

- Ceux prélevés aux sites n°1 et n°2, de plusieurs centimètres d'épaisseurs, dont la majeure partie est en cours de dégradation, à l'exception d'une fine couche de surface. Les observations ayant pour l'essentiel porté sur la partie moribonde, ces deux tapis seront parfois dénommés ci-après « *tapis microbiens moribonds* ».
- Celui prélevé au site n°3, de quelques millimètres d'épaisseur, et ne comportant pas de zone en décomposition. Par opposition avec la première catégorie, ce tapis sera parfois dénommé ci-après « *tapis microbien vivant* ».

### 3.5.2. Fossilisation expérimentale d'un tapis microbien vivant

Tableau 3-XVI : Silicification expérimentale d'un tapis vivant d'Octopus Spring. Bilan des échantillons : images MEB /MET et spectres présentés dans les figures.

Temps d'exposition	MEB		Cryo-MEB	MET
	Micrographies	Spectres EDX		
<i>Etat naturel</i>	3-26a/3-26b	3-26c/3-26d	3-26e/ 3-26f	3-27a/3-27b/ 3-27c/3-27d/3-27e
<i>2 semaines</i>	3-28a	3-28b	-	3-28c
<i>5 mois</i>	3-29a/3-29c/3-29d	3-29b	-	3-30 (planche entière)
<i>1 an</i>	3-31a/3-31b/	3-31e	-	-
	3-31c/3-31d			

#### 3.5.2.1. Aspect naturel du tapis à *Chloroflexus* du Site n°3

En microscopie électronique à balayage, après dessiccation par la méthode du point critique, la partie rouge du tapis microbien du site n°3 montre un enchevêtrement de différents micro-organismes, et de substances polymériques (EPS) secrétées par ces bactéries (Fig. 3-26a). Les filaments de *Chloroflexus aurantiacus*, ou apparentés, sont dominants dans ce tapis, mais cohabitent avec tout un florilège de micro-organismes qui n'ont pas pu être identifiés avec certitude : des bâtonnets de différentes tailles, des coques, des filaments de plus petite taille. Les grands bâtonnets (2 µm de largeur, 5 µm ou plus de longueur) ont été identifiés comme étant les cyanobactéries *Synechococcus lividus*, ou des espèces apparentées. Toutes ces cellules sont liées entre elles par une importante matrice d'EPS à l'aspect fibreux. Sur les vues rapprochées (Fig. 3-26b), on note que les EPS, et, dans une moindre mesure les cellules, présentent un certain nombre de grains minéraux à leur surface. Les analyses EDX à 5kV (Fig. 3-26c) montrent un net signal du silicium, indiquant qu'il s'agit de silice, présente naturellement dans l'environnement de la source chaude et dans son eau.

Les analyses EDX à 10 kV (Fig. 3-26d) nous donnent plus de détails quant à la composition d'ensemble du tapis. Les signaux du carbone (C), de l'azote (N) et une partie du signal de l'oxygène (O) viennent de la matière organique (cellules et EPS) ; les autres signaux (oxygène (O), Sodium (Na), aluminium (Al), silicium (Si), calcium (Ca)) témoignent des différents éléments minéraux présents dans le tapis et dont la silice (SiO<sub>2</sub>) semble être le composant principal.

Préparé par la méthode du Cryo-MEB, ce même tapis montre un aspect sensiblement différent. La cryo-préparation est réputée préserver très fidèlement les structures naturelles. Le tapis microbien présente un aspect homogène, avec une structure alvéolaire (Fig. 3-26e). Les parois de ces alvéoles, mesurant environ 2  $\mu\text{m}$  de diamètre, sont a priori constituées d'EPS. Ces derniers ont donc incontestablement un aspect différent selon le mode de préparation utilisé. Même si ces EPS cachent une bonne partie de l'intérieur de l'échantillon, il faut noter que la densité cellulaire apparente des filaments de *Chloroflexus* apparaît bien moindre qu'après une préparation par la méthode du point critique (Fig. 3-26f) qui a entraîné une contraction des tapis. Dans ce cas, l'aspect de l'échantillon dépend donc clairement de la technique de préparation utilisée.

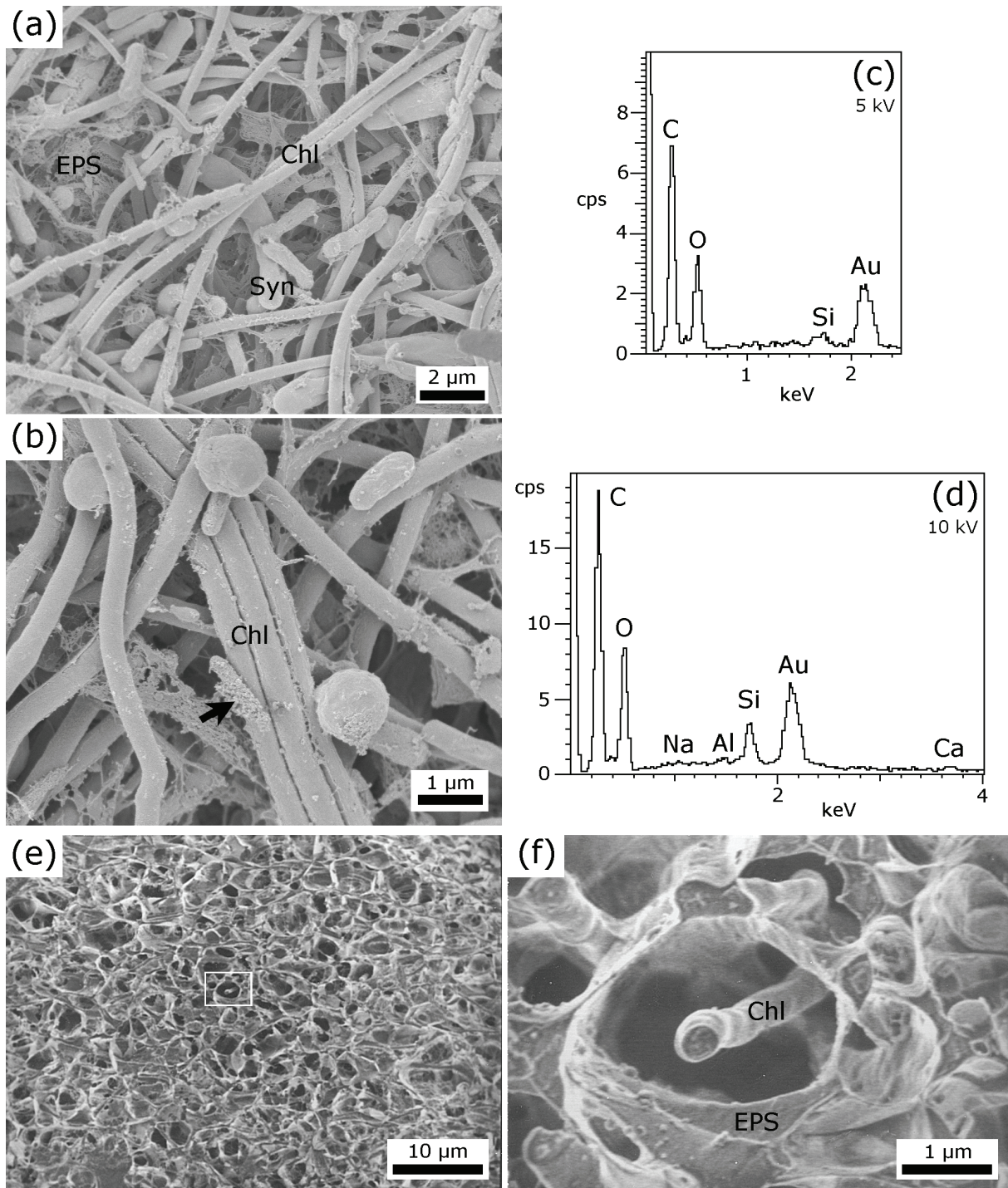
Les observations en microscopie électronique en transmission (MET) confortent les observations faites au MEB. Les micrographies montrent que les filaments de *Chloroflexus* représentent la majorité des structures observées (Fig. 3-27a). L'organisation et la structure de la paroi de ces filaments apparaissent sur les coupes contrastées : une membrane cytoplasmique enserme l'intérieur de la cellule, tandis qu'une gaine de matière fibreuse entoure les cellules (Figs. 3-27b et c) dans laquelle celles-ci semblent flotter. La population des filaments compte une proportion non négligeable de gaines vides (Figs. 3-27a et d), qui sont ce qu'il reste des cellules mortes. Ces gaines vides apparaissent également sur les coupes non-contrastées (Fig. 3-27e), sous la forme d'anneaux clairs et nébuleux, associés à des textures similaires qui ont été attribuées aux EPS.

Les coupes contrastées et non contrastées ont également montré, parmi les cellules, des grains de tailles diverses, dont les plus gros atteignent 100 nm de diamètre (Fig. 3-27d et 3-27e). Il s'agit certainement de grains de silice, minéral identifié lors des analyses EDX au MEB.

### **3.5.2.2. Fossilisation du tapis à *Chloroflexus* du site n°3**

#### ***Après 2 semaines***

Après deux semaines d'exposition à la solution de silice à une concentration de 500 ppm, le tapis à *Chloroflexus* du site n°3 présente visuellement un aspect plus dense qu'à l'état



#### Silicification d'un tapis microbien vivant d'Octopus Spring.

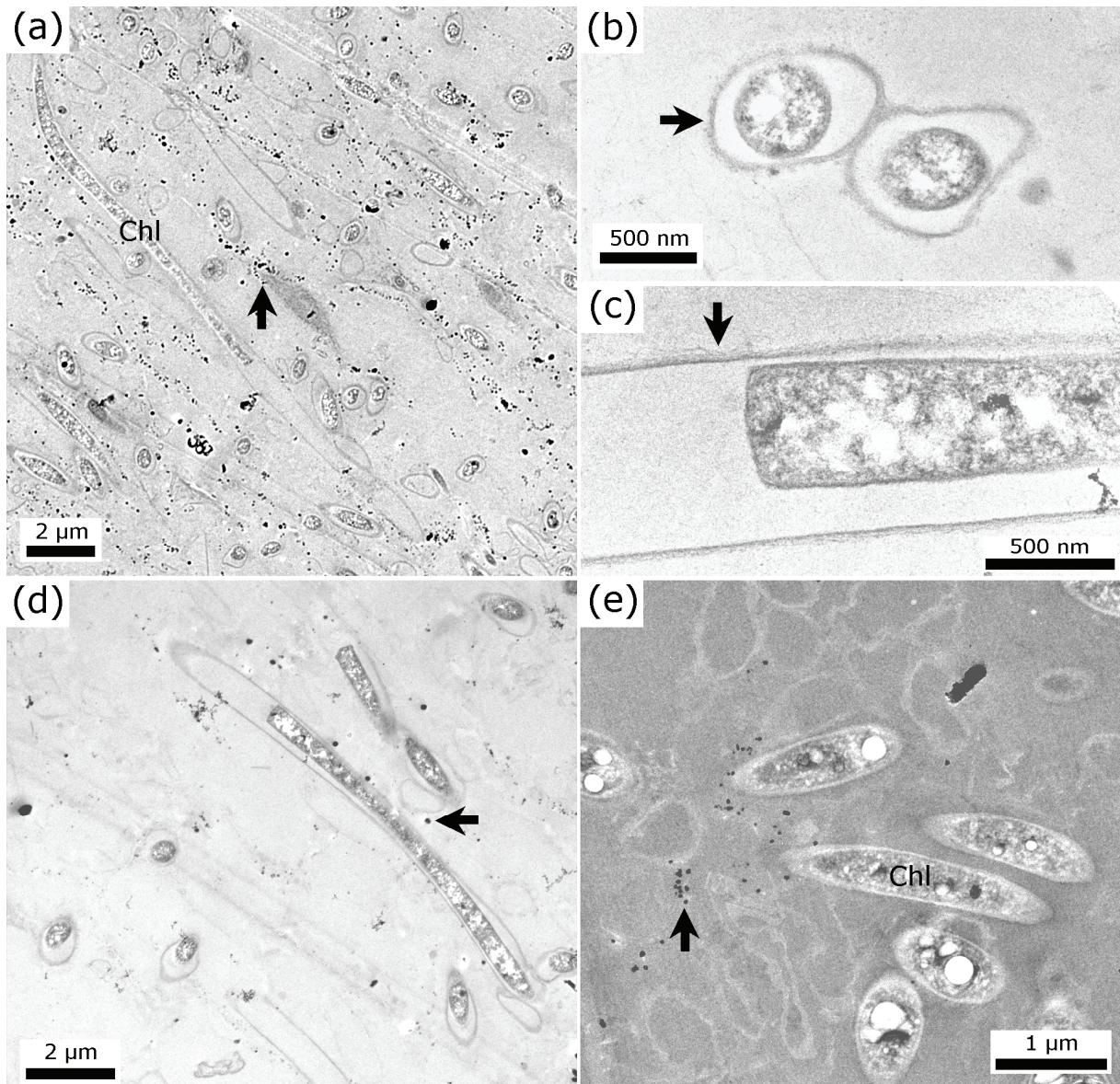
**Fig. 3-26 :** Aspect naturel du tapis à *Chloroflexus* du site n°3 : Micrographies MEB, avec les spectres EDX correspondants, et Cryo-MEB, montrant l'état naturel du tapis à *Chloroflexus* d'Octopus Spring prélevé au site n°3.

**Micrographies MEB :** (a) Vue d'ensemble du tapis, avec les spectres EDX correspondants (c) et (d), obtenus sur une large zone du tapis, à respectivement 5 et 10 kV. Le tapis présente des filaments de *Chloroflexus* (Chl), des bâtonnets de *Synechococcus* (Syn), des bâtonnets plus petits, ainsi que des coques. Les cellules sont liées ensemble par des EPS filamenteux (EPS). Noter les pics du silicium (Si) sur les deux spectres EDX, ainsi que de faibles pics du sodium (Na), de l'aluminium (Al) et du calcium (Ca) qui apparaissent à 10 kV. (b) Vue rapprochée sur les filaments de *Chloroflexus* (Chl). Noter les grains de silice présents à la surface des cellules de tous types, et des EPS (flèches).

**Micrographies Cryo-MEB :** (e) Vue d'ensemble du tapis, montrant la structure naturelle alvéolaire du réseau d'EPS. (f) Vue rapprochée montrant l'une de ces alvéoles d'EPS (EPS), ainsi que des filaments de *Chloroflexus*. Noter la différence d'aspect des EPS par rapport aux observations en MEB classique, ainsi que la faible densité cellulaire sur le tapis observé en Cryo-MEB.

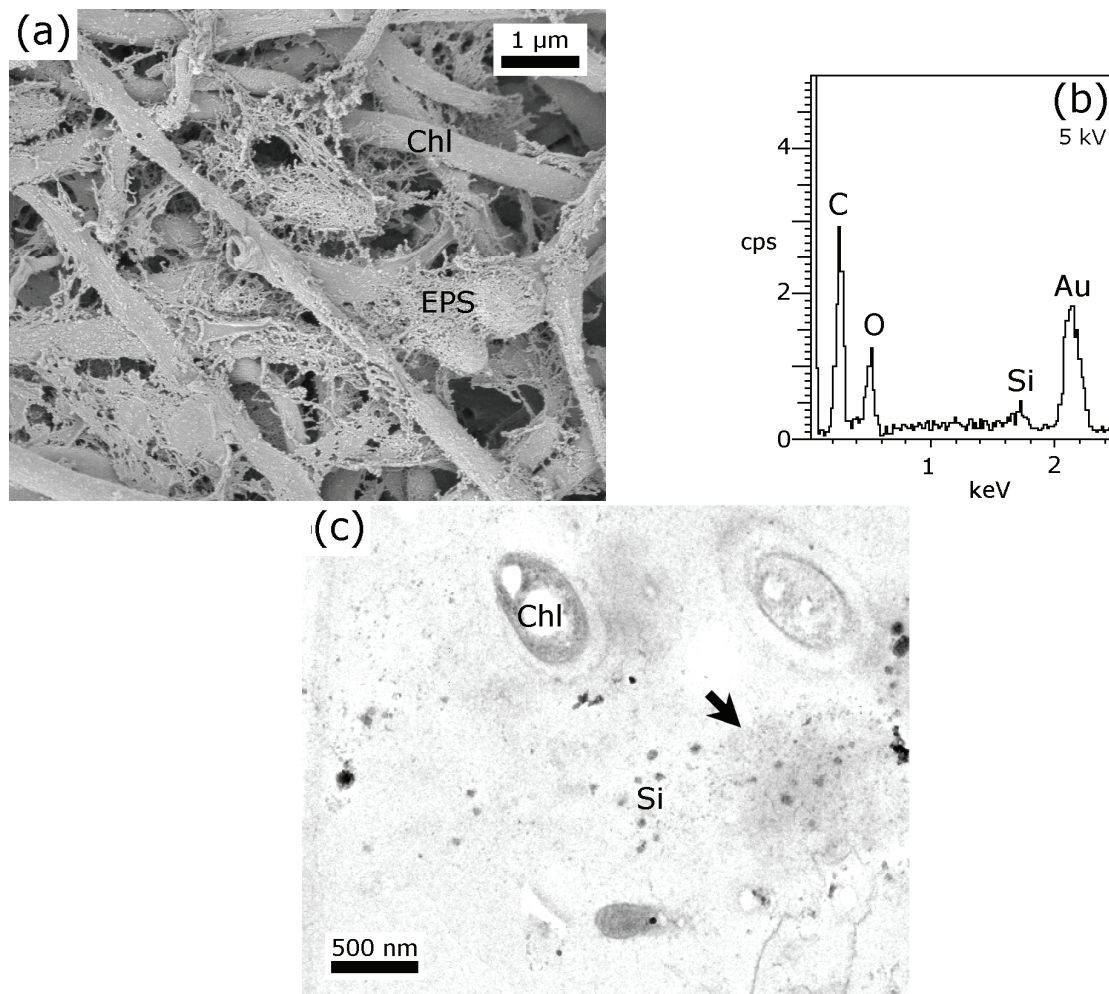
Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 1 kV.



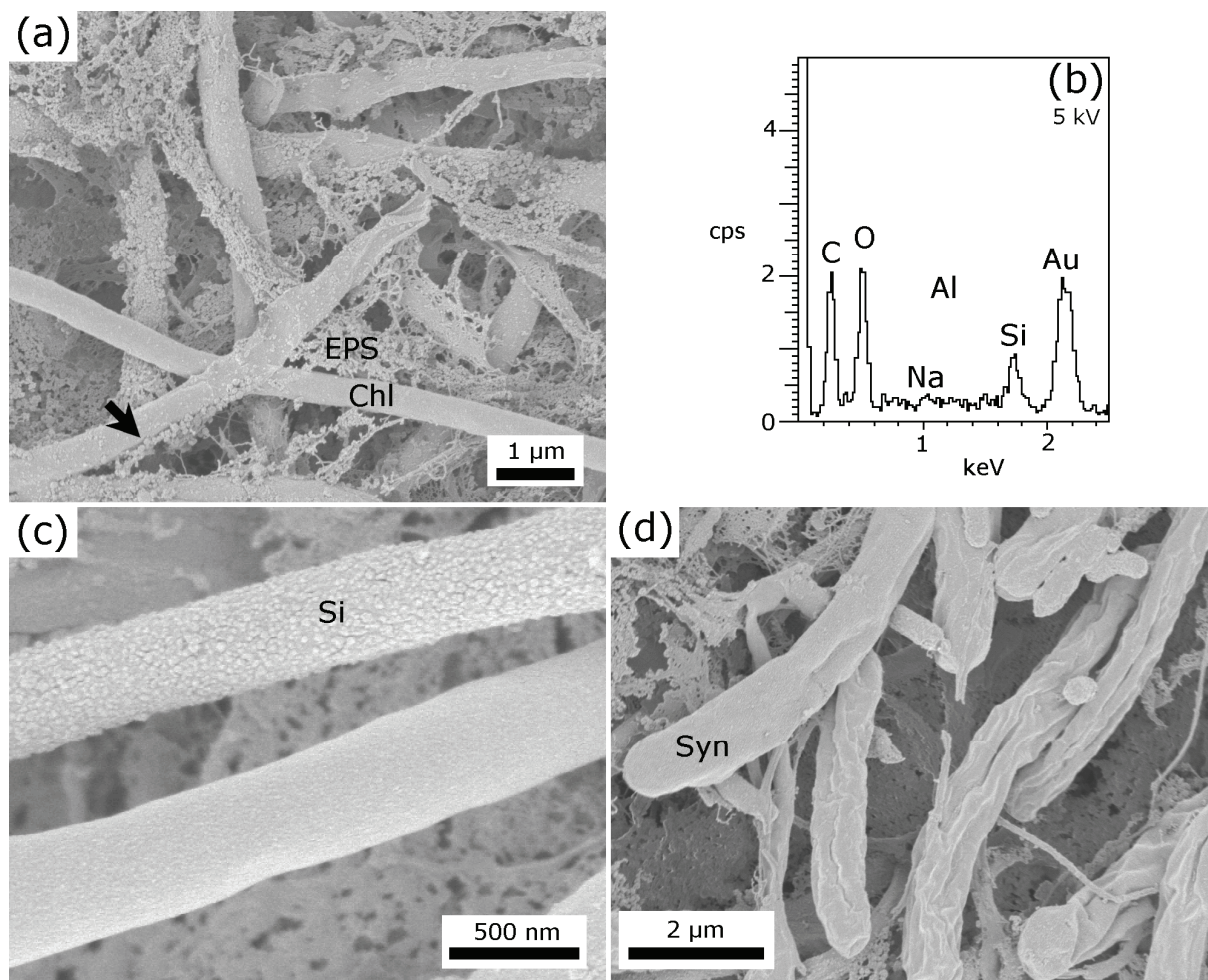


**Fig. 3-27 :** *Aspect naturel du tapis à Chloroflexus du site n°3 :* Micrographies MET, montrant l'état naturel du tapis à *Chloroflexus* d'Octopus Spring prélevé au site n°3. **(a)** Vue d'ensemble du tapis, montrant un grand nombre de filaments de *Chloroflexus* (Chl) en coupe directe ou en biais, et un grand nombre de grains de silice (flèche). Coupe contrastée. **(b) (c)** Vue en coupe transversale et longitudinale de filaments de *Chloroflexus*. Noter la gaine d'environ 50 nm d'épaisseur qui entoure les cellules (flèches). Coupes contrastées. **(d)** Vue rapprochée sur les filaments de *Chloroflexus*. Noter la présence de gaines vides, et de grains de silice dans l'entourage des cellules (flèche). Coupe contrastée. **(e)** Coupe non contrastée. Vue rapprochée sur les filaments de *Chloroflexus* (Chl). Noter la présence de grains de silice (flèche), l'aspect clair de la membrane cellulaire, et des gaines vides qui sont parfois déformées. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 200 kV.



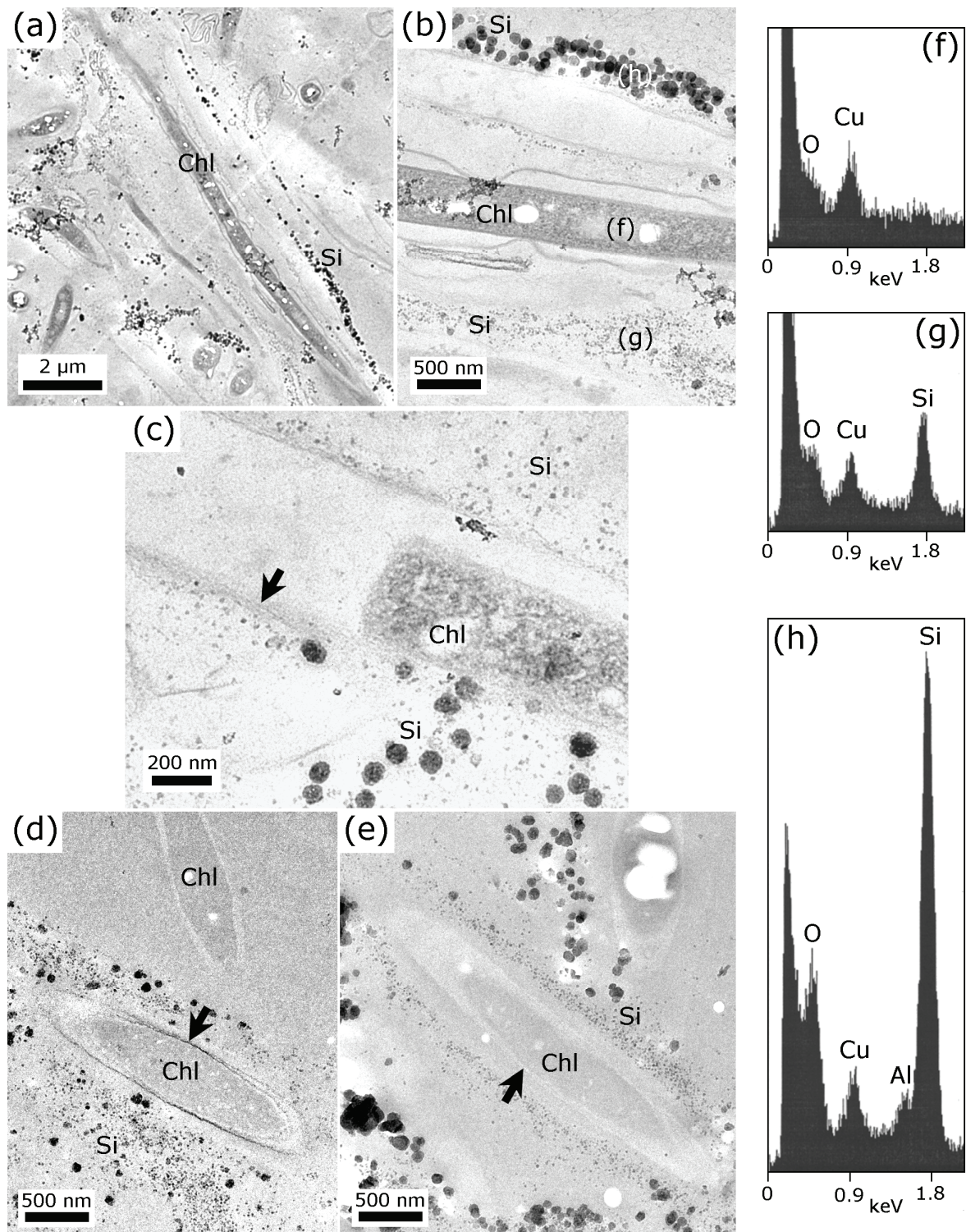


**Fig. 3-28 :** 2 semaines de fossilisation, tapis à *Chloroflexus* du site n°3 : Micrographies MEB et MET, avec le spectres EDX correspondant, montrant le tapis à *Chloroflexus* du site n°3, exposé à une solution de silice à une concentration de 500 ppm pendant 2 semaines. **(a)** Micrographie MEB, et le spectre EDX correspondant **(b)** obtenu à 5kV sur une zone large du tapis. Vue d'ensemble du tapis, montrant les filaments de *Chloroflexus* (Chl), et le réseau d'EPS (EPS). Noter les grains de silice qui ont précipité sur ces EPS. Noter le pic du silicium (Si) sur le spectre EDX. La micrographie a été obtenue à un voltage de 1 kV. **(c)** Micrographie MET. Noter la présence, parmi les filaments de *Chloroflexus* (Chl) et les grains de silice (Si) déjà observés à l'état naturel, et d'une fine granulation de silice (flèche). Coupe contrastée. La micrographie a été obtenue à un voltage de 200 kV.



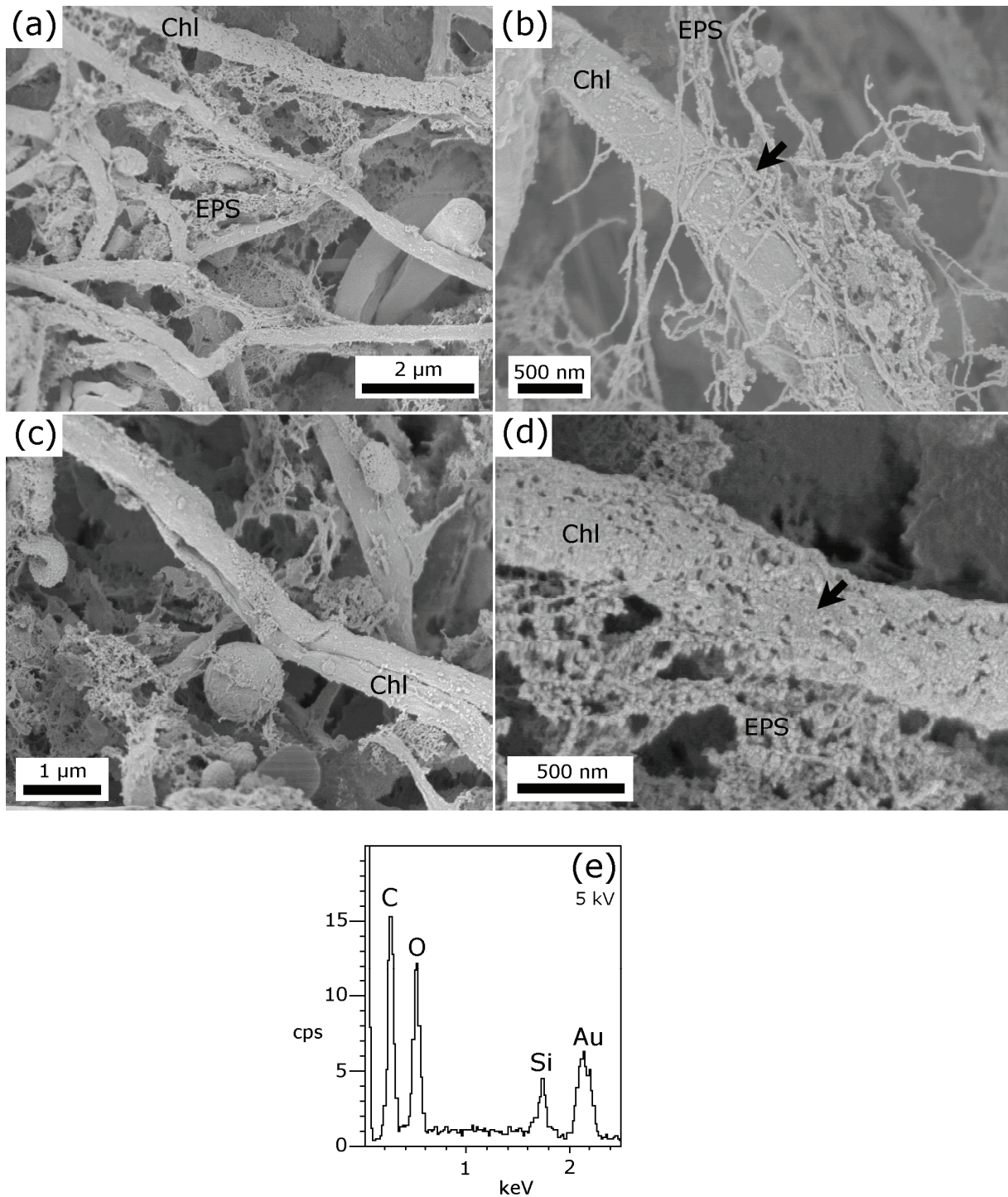
**Fig. 3-29 :** 5 mois de fossilisation, tapis à *Chloroflexus* du site n°3 : Micrographies MEB, avec le spectre EDX correspondant, montrant le tapis à *Chloroflexus* du site 3, exposé à une solution de silice à une concentration de 500 ppm pendant 5 mois. **(a)** Vue d'ensemble du tapis, avec le spectre EDX correspondant **(b)** obtenu à 5 kV sur une zone large du tapis, montrant les filaments de *Chloroflexus* (Chl) et le réseau d'EPS (EPS). Noter la grande quantité de grains de silice (flèche) qui a précipité sur ces EPS, et sur les filaments, dans une moindre mesure. **(c)** Vue rapprochée de deux filaments de *Chloroflexus*. Noter la forte précipitation de grains de silice (Si) sur l'un, et l'absence d'une telle minéralisation sur l'autre. **(d)** Bâtonnets déformés de *Synechococcus* (Syn). Les particules de silice ayant précipité à la surface sont difficilement visibles. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 1 kV.





**Fig. 3-30 :** 5 mois de fossilisation, tapis à *Chloroflexus* du site n°3 : Micrographies MET, avec les spectres EDX correspondants, montrant des coupes du tapis à *Chloroflexus* du site n°3, exposé à une solution de silice à une concentration de 500 ppm pendant 5 mois. **(a)** Vue d'ensemble du tapis montrant les filaments de *Chloroflexus* (Chl), ainsi les grains de silice (Si). Coupe contrastée. **(b)** Vue rapprochée, avec les spectres EDX correspondants **(f)**, **(g)** et **(h)**, sur un filament de *Chloroflexus* (Chl) dans sa gaine (S). De gros grains (Si), ainsi que des grains plus fins (Si) sont présents dans l'entourage de la cellule. Les spectres **(f)**, **(g)** et **(h)** ont été obtenus, respectivement, sur le filament, sur les grains fins de silice, et sur les gros grains. Noter l'absence de pic du silicium sur le spectre **(f)**, et la présence d'un pic de l'aluminium sur le spectre **(h)**. **(c)** Vue rapprochée sur l'extrémité d'une cellule de *Chloroflexus* (Chl) et sa gaine (flèche). Noter l'absence de grains de silice (Si) à l'intérieur de la gaine. Coupe contrastée. **(d)** Coupe non contrastée. Filament de *Chloroflexus* (Chl) entouré par des grains de silice de toute taille (Si). Noter la minéralisation sur la gaine (flèche), et le filament à proximité vierge de toute minéralisation. **(e)** Coupe non contrastée. Filament de *Chloroflexus* (Chl) entouré par des grains de silice (Si) de toutes taille. Noter l'absence de minéralisation sur la gaine (flèche). Toutes les micrographies et les spectres EDX ont été obtenus à un voltage de 200 kV.





**Fig. 3-31 :** 1 an de fossilisation, tapis à *Chloroflexus* du site n°3 : Micrographies MEB, avec le spectre EDX correspondant, montrant le tapis à *Chloroflexus* du site n°3, exposé à une solution de silice à une concentration de 500 ppm pendant 1 an. **(a)** Vue d'ensemble du tapis, avec le spectre EDX correspondant **(e)** obtenu à 5 kV sur une zone large du tapis, montrant les filaments de *Chloroflexus* (Chl) et le réseau d'EPS (EPS). Noter le pic du silicium (Si) sur le spectre EDX. **(b)** Vue rapprochée sur un filament de *Chloroflexus* (Chl) et sur les EPS (EPS). Noter la grande quantité de grains de silice (flèche) qui a précipité sur ces EPS et sur le filament. Noter également l'aspect filamenteux des EPS. **(c)** Vue rapprochée sur deux filaments de *Chloroflexus* (Chl) et le réseau d'EPS. Noter la déformation des filaments. **(d)** Vue rapprochée sur un filament de *Chloroflexus* (Chl) et les EPS (EPS). Noter la forte quantité de grains de silice (flèche) précipités sur la paroi cellulaire et les EPS. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 1 kV.

naturel (Fig. 3-28a). En effet, on y observe sur les EPS une forte granulation de silice, bien plus développée que dans les échantillons naturels. La granulation sur les cellules est également plus marquée. La silice n'a toutefois pas précipité en quantités suffisantes pour que les spectres EDX (Fig. 3-28b, 5 kV) puissent montrer une augmentation du signal du Si par rapport aux analyses faites sur les échantillons naturels.

Le MET confirme cette précipitation de grains de silice, en supplément des grains de silice « naturels » déjà mentionnés précédemment. Les micrographies montrent l'apparition de fines particules de silice de quelques nanomètres dans l'entourage des cellules (Fig. 3-28c).

### **Après 5 mois**

Après 5 mois de fossilisation expérimentale, le tapis microbien présente dans l'ensemble le même aspect qu'après 2 semaines de fossilisation : les EPS apparaissent toujours denses du fait de la précipitation de silice (Fig. 3-29a). Les filaments de *Chloroflexus* sont en majorité en bon état, même si certaines cellules étaient visiblement lysées (Fig. 3-29a). Si l'augmentation de la quantité de particules de silice précipitées sur les EPS était visible, le constat était moins évident pour les cellules. Les micrographies MEB montrent une hétérogénéité de la précipitation de silice sur la paroi des cellules : certaines cellules visiblement vierges de toute précipitation côtoient des cellules fortement minéralisées (Fig. 3-29b). Les bâtonnets de *Synechococcus* observés étaient fortement déformés, mais montraient aussi un début de précipitation de silice sur leurs parois (Fig. 3-29d). Les analyses EDX à 5kV montrent un signal du silicium plus important que pour les échantillons précédents (Fig. 3-29b) ; un faible signal du sodium (Na) est également présent.

En confirmation de l'impression donnée par les observations au MEB, une bonne partie des filaments observés au MET étaient en très bon état, avec une structure de paroi parfaitement préservée, et les détails du cytoplasme visibles sur les coupes contrastées (Fig. 3-30a et 3-30b). Des gaines vides étaient également présentes, avec sensiblement le même rapport gaines vides / gaines pleines que pour le même tapis observé dans son état naturel.

Sur l'ensemble de l'échantillon, le nombre de grains de silice présents est très élevé (Fig. 3-30a), avec des accumulations par endroits. La Fig. 3-30b nous montre qu'il y a deux populations de grains de silice. La première comporte des grains assez gros (100 nm environ) et la seconde, des grains nettement plus petits (10 nm environ). Dans chacune de ces populations, la taille des grains est uniforme. Les vues rapprochées suggèrent que les plus gros grains de silice pourraient être des accumulations de particules plus petites (Fig. 3-30c).

Les analyses EDX réalisés sur ces différents types de grains ont confirmé leur nature siliceuse, et montré de légères différences de composition selon le type de grain. Le signal du cuivre (Cu) vient de la grille de cuivre qui supporte la coupe ultra-fine. Les analyses faites sur les « gros » grains montrent un important signal du silicium, associé à un léger signal de l'aluminium (Fig. 3-30h). Celles réalisées sur les « petits » grains ne montrent qu'un signal du silicium (Fig. 3-30g). Enfin des analyses faites sur les filaments de *Chloroflexus* ne montrent aucun signal du silicium (Fig. 3-30f).

Ces grains de silice sont parfois au contact de la gaine extérieure des filaments. En revanche, ils sont absents à l'intérieur, que ce soit sur la membrane cytoplasmique ou au sein même du cytoplasme. L'hétérogénéité de la précipitation de silice sur les cellules est visible sur les coupes non contrastées. Certaines cellules (Fig. 3-30e) ont leur entourage encombré de particules de silice de toutes tailles, sans qu'aucun signe de précipitation de silice ne soit pour autant visible sur les structures cellulaires. A noter, sur cette même Fig. 3-30e, la présence d'une cellule sans aucun grain de silice autour d'elle. Pour d'autres filaments dans une configuration similaire (Fig. 3-30d), la gaine externe est nettement contrastée, et apparaît granuleuse quand elle est coupée de biais. Ceci témoigne d'une précipitation sur cette gaine de fines particules de silice, qui bloquent le faisceau d'électron et créent un contraste.

### ***Après 1 an***

Après un an de fossilisation expérimentale, l'aspect général du tapis, observé sous le MEB (Fig. 3-31a), n'a pas particulièrement changé, avec un mélange de filaments, de bâtonnets, de coques et d'EPS. La plupart des filaments de *Chloroflexus* montrent des signes évidents de déformation : leur paroi, auparavant lisse, a désormais un aspect fibreux, boisé (Fig. 3-31c). Tous les filaments de *Chloroflexus* présentent des signes de précipitation de silice sur leur paroi. Il y a cependant toujours une hétérogénéité dans le degré de silicification : alors que certains filaments sont seulement parsemés de particules de silice (Fig. 3-31c), d'autres en sont entièrement recouverts (Fig. 3-31d).

Les EPS sont bien préservés et présentent toujours un aspect fibreux. La précipitation de silice sur ces EPS est également hétérogène : tantôt il ne s'agit que d'une fine précipitation sur les fibres d'EPS (Fig. 3-31b), tantôt les granules de silice densifient fortement le réseau (Fig. 3-31a). Les analyses EDX faites à 5 kV sur l'ensemble du tapis montrent toujours un fort signal du carbone (matière organique) associé à celui du silicium (silice) (Fig. 3-31e).



**Tableau 3-XVII : Bilan des observations faites au MEB sur les filaments de *Chloroflexus*, lors de la fossilisation expérimentale du tapis microbien vivant prélevé au site n°3 à Octopus Spring.**

MORPHOLOGIE						
Temps d'exposition	Aspects généraux	Préservation de la paroi	Cytoplasme	EPS		
<i>Etat naturel</i>	Nombreux filaments sans signes de déformation. Quelques gaines vides.	Rien à signaler	Net aspect granuleux	Structure alvéolaire, en réseau		
<i>2 semaines</i>	Quelques filaments déformés	Très bonne	Pas de données suffisantes	Structure en réseau clairement identifiable		
<i>5 mois</i>	Bon aspect dans l'ensemble. Quelques filaments déformés.	Très bonne	Pas de signes de lyse, Net aspect granuleux	Structure en réseau clairement identifiable		
<i>1 an</i>	Nets signes de déformations pour l'ensemble des cellules.	-	-	Structure filamenteuse et en réseau clairement identifiable		

SILICIFICATION						
Temps d'exposition	Cytoplasme	Paroi	Gaine	EPS	Degré relatif de silicification	EDX / Signal de la silice
<i>Etat naturel</i>	Nul	Quelques particules de silice présentes.	Quelques particules de silice naturelle accumulée sur les gaines	Quelques particules de silice présentes	Quasi-nul	Léger
<i>2 semaines</i>	Nul	Pas de données suffisantes	Pas de données suffisantes	Forte minéralisation	Débutant	Léger
<i>5 mois</i>	Nul	Hétérogène. Quelques filaments fortement minéralisés	Accumulation de grains de silice (naturels et néo-formés).	Forte minéralisation	Hétérogène, et bien avancé	Important
<i>1 an</i>	Nul	La plupart des filaments sont maintenant minéralisés.	-	Forte minéralisation	Homogène Relativement important	Important

### **3.5.3. Fossilisation expérimentale d'un tapis microbien moribond**

La seconde partie des observations concerne les tapis à *Chloroflexus* des sites n°1 et 2, qui étaient dans les deux cas d'une certaine épaisseur, et contenant en grande partie des micro-organismes morts ou moribonds. Les échantillons observés étaient probablement

originellement localisés à une certaine profondeur dans l'épaisseur du tapis et ne bénéficiaient donc que d'une faible exposition à la lumière.

**Tableau 3-XVIII : Silicification expérimentale d'un tapis moribond d'Octopus Spring. Bilan des échantillons : images MEB /MET et spectres présentés dans les figures.**

Temps d'exposition	MEB		MET
	Micrographies	Spectres EDX	
<i>Etat naturel</i>	Site n°1 : 3-32a/3-32b/3-32c Site n°2 : 3-33a/3-333b	Site n°1 : 3-32d/3-32e Site n°2 : 3-33c	Site n°1 : 3-32f/3-32g/3-32h
<i>2 semaines</i>	Site n°1 : 3-34a/3-34c/3-34d	Site n°1 : 3-34b	-
<i>5 mois</i>	Site n°1 : 3-35a/3-35b Site n°2 : 3-35d/3-35e	Site n°1 : 3-35c Site n°2 : 3-35f/3-35g	Site n°1 : 3-36a à 3-36e
<i>1 an</i>	Site n°1 : 3-37a/3-37b/3-37c	Site n°1 : 3-37d	-

### 3.5.3.1. Aspect naturel du tapis à *Chloroflexus* des sites n°1 et n°2

L'aspect général des tapis microbiens de ces deux sites (Fig. 3-32a, site n°1 ; Fig. 3-33a, site n°2) se différencie de manière franche avec ce qui pouvait être observé sur le site n°3. On ne distingue en effet qu'un enchevêtrement d'EPS au milieu desquels se trouvent quelques bâtonnets. Le tapis microbien est parcouru de nombreux filaments torsadés (Fig. 3-32b, site n°1 ; Fig. 3-33a, site n°2), attribués à des restes de filaments de *Chloroflexus*. Les filaments du site n°1 semblent être dans un état de dégradation plus avancé que ceux du site n°2. Des filaments en bon état sont cependant présents dans le prélèvement du site n°1 (Fig. 3-32c). Les micrographies y ont aussi montré une granulation de silice similaire à celle précédemment constatée sur le tapis vivant du site n°3, et ce, aussi bien sur les restes de filaments que sur les EPS (Fig. 3-32c, site n°1 ; Fig. 3-33b, site n°2).

Les analyses EDX à 5 kV faites sur les tapis des deux sites (Fig. 3-32d, site n°1 ; Fig. 3-33c, site n°2) montrent les pics de carbone (C), d'azote (N) et d'oxygène (O) associés à la matière organique, ainsi qu'un pic du silicium signalant la présence de silice en quantité importante dans cette portion du tapis. Les analyses EDX faites à 10 kV pour le site 1 (Fig. 3-33e) détaillent la composition des espèces minérales présentes dans le tapis en montrant les signaux du sodium (Na), de l'aluminium (Al) et du calcium (Ca).

Les micrographies MET réalisées sur le tapis à *Chloroflexus* du site n°1 confirme qu'il ne contenait pas ou peu de cellules vivantes. On y trouve essentiellement des gaines de filaments vides, qui correspondent aux restes des filaments observés au MEB (Fig. 3-32f). Ces gaines vides sont souvent entourées d'un grand nombre de grains de silice, dont la taille avoisine les 50 nm. Ces grains de silice sont parfois directement associés aux gaines vides (Fig. 3-32g). Les analyses EDX faites sur ces grains montrent un important pic de silicium, ainsi que des traces d'aluminium (Fig. 3-32h).

### **3.5.3.2. Fossilisation du tapis à *Chloroflexus* des sites n° 1 et n°2**

#### ***Après 2 semaines***

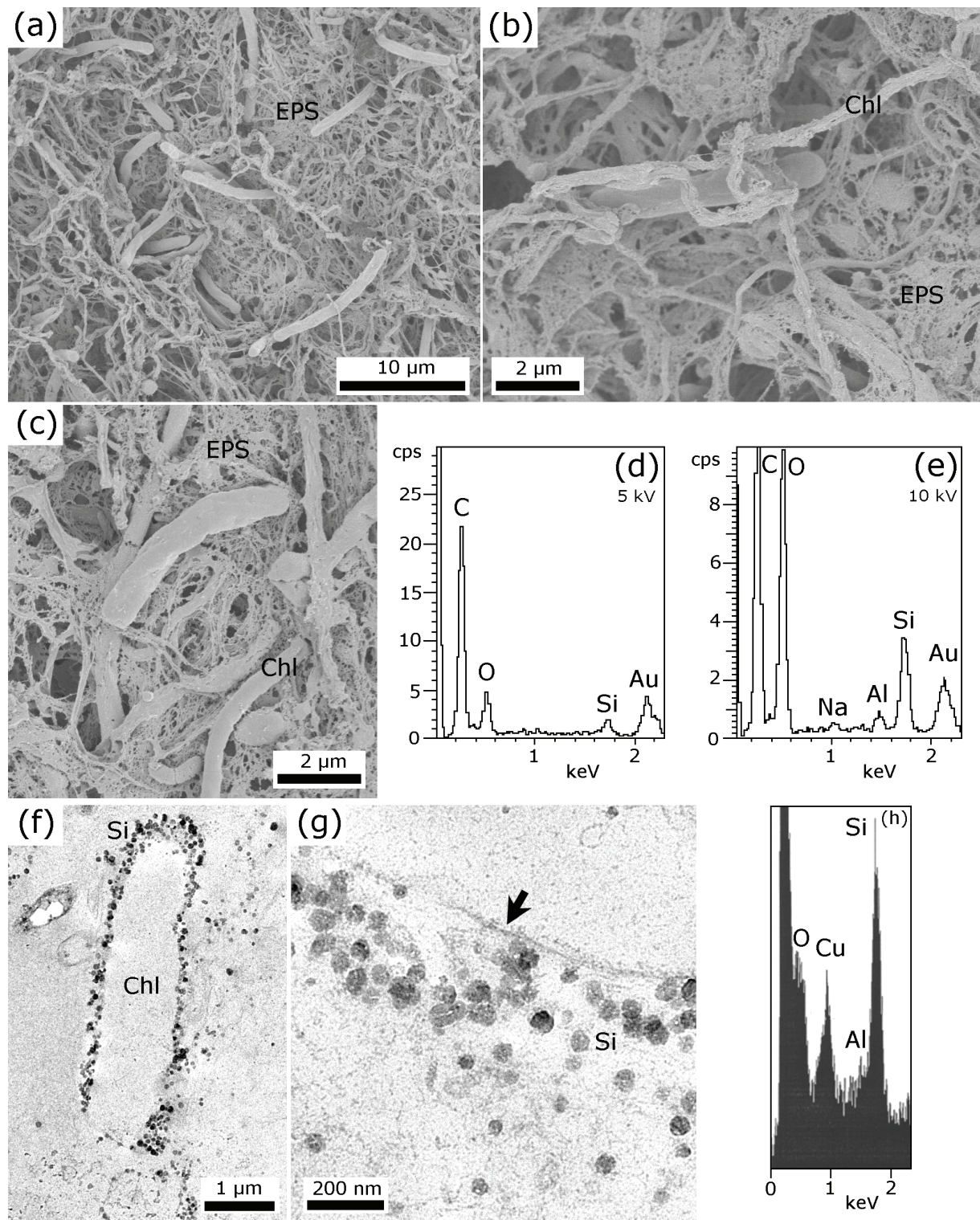
Au bout de deux semaines de fossilisation, le tapis à *Chloroflexus* du site n°1 présente, comme celui du site n°3, un aspect beaucoup plus dense que celui qu'il avait originellement (Fig. 3-34a). Des restes de filaments de *Chloroflexus* sont aussi présents en grand nombre, ainsi que des bâtonnets déformés (Fig. 3-34c).

La granulation de silice sur les restes de filaments est importante (Fig. 3-34c), et semble-t-il, supérieure à celle observée sur le même échantillon à l'état naturel. Une minéralisation, plus faible, est également apparue sur les bâtonnets. La texture de cette granulation est similaire à celle qui s'est développée au cours de la fossilisation expérimentale des tapis à *Chloroflexus* du site n°3, avec des granules de silice de quelques dizaines de nanomètres. Davantage de particules de silice (autour de 50 nm) ont précipité sur les EPS (Fig. 3-34d).

Les analyses EDX faites à 5 kV (Fig. 3-34d) montrent un signal du silicium (Si), qui ne semble toutefois pas être supérieur à celui constaté à l'état naturel. Ces analyses confirment la présence de sodium et d'aluminium dans ce tapis.

#### ***Après 5 mois***

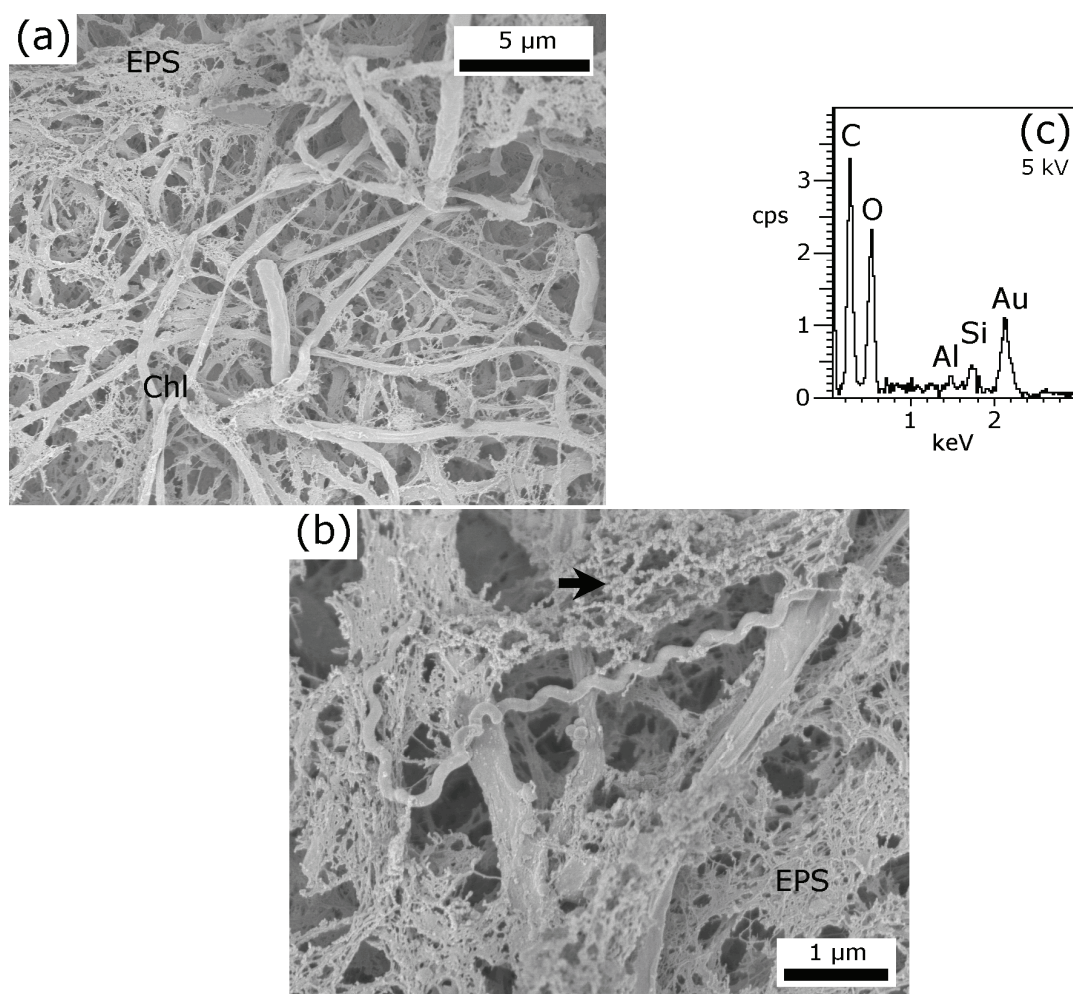
Après cinq mois de fossilisation expérimentale, l'aspect général des tapis à *Chloroflexus* des sites n°1 et 2 n'a pas fondamentalement changé par rapport à celui qu'il avait après deux semaines. Les restes de filaments de *Chloroflexus* sont encore présents en grand nombre (Fig. 3-35a, site n°1 ; Fig. 3-35d, site n°2). La seule différence notable concerne les EPS. Si la structure en toile d'araignée observée précédemment est encore prédominante, les EPS apparaissent par endroit sous forme de morceaux de membranes



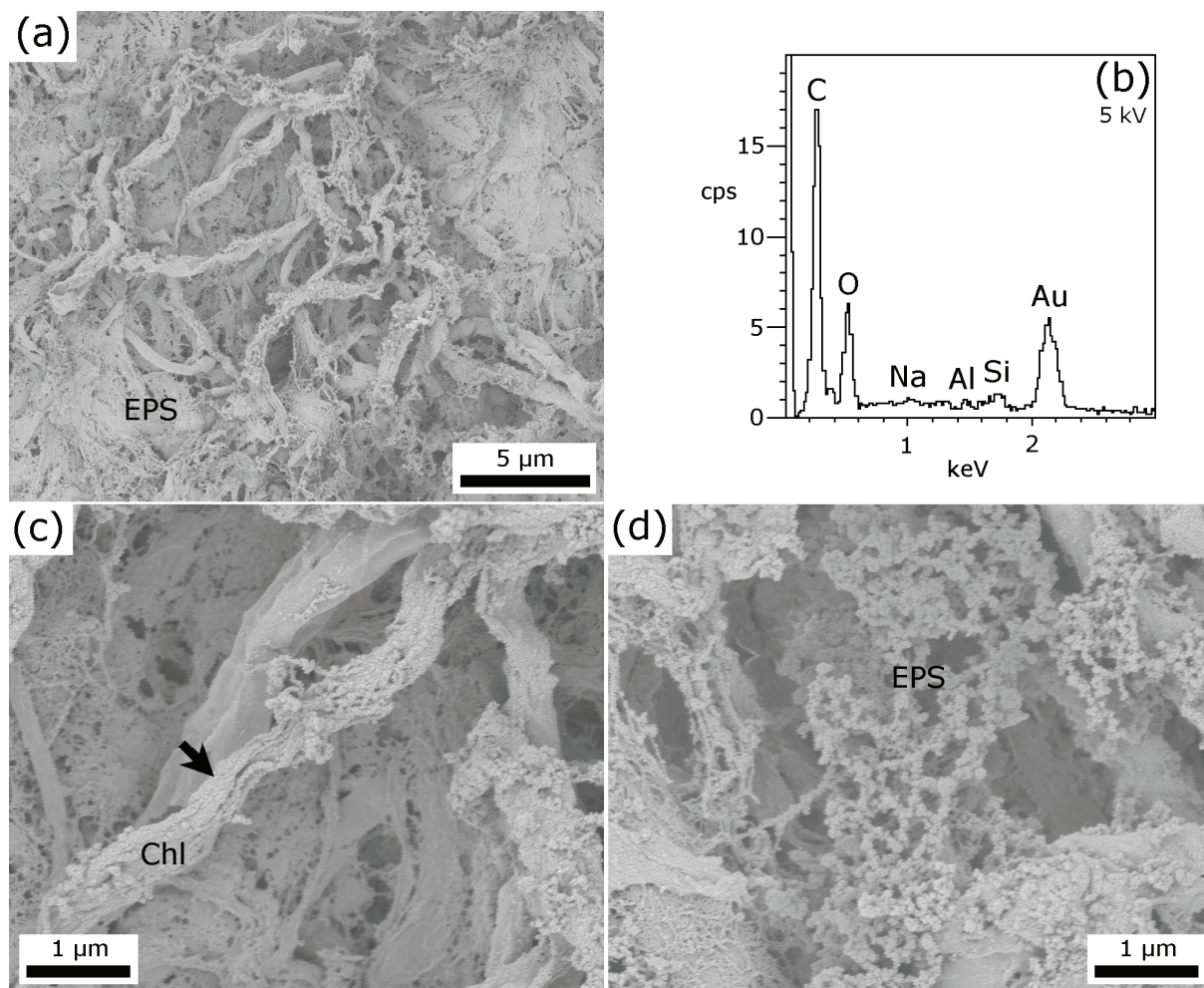
**Silicification d'un tapis microbien moribond d'Octopus Spring.**

**Fig. 3-32 :** Aspect naturel du tapis à *Chloroflexus* du site n°1 : Micrographies MEB et MET, avec les spectres EDX correspondants, montrant l'état naturel du tapis à *Chloroflexus* d'Octopus Spring prélevé au site n°1. Micrographies MEB : (a) Vue d'ensemble du tapis, avec les spectres EDX correspondants (c) et (d), obtenus sur une large zone du tapis, à respectivement 5 et 10 kV. Des bâtonnets sont visibles. Le reste du tapis est un mélange d'EPS et de restes bactériens. Noter les pics du silicium (Si) sur les deux spectres EDX, ainsi que les faibles pics du sodium (Na) et de l'aluminium (Al) qui apparaissent à 10 kV. (b) Vue rapprochée montrant des restes de filaments de *Chloroflexus* (Chl), avec le réseau d'EPS (EPS) à l'arrière plan. (c) Vue rapprochée montrant quelques bâtonnets et filaments de *Chloroflexus* (Chl) en apparent bon état, avec la matrice d'EPS (EPS) en arrière plan. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 1 kV. Micrographies MET : (f) Vue d'une gaine vide de *Chloroflexus* (Chl) entourée de grains de silice (Si). Le spectre EDX correspondant (h) a été obtenu sur les grains de silice. Coupe contrastée. (g) Vue rapprochée sur la gaine (flèche) et les grains de silice (Si). Coupe contrastée. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 200 kV.



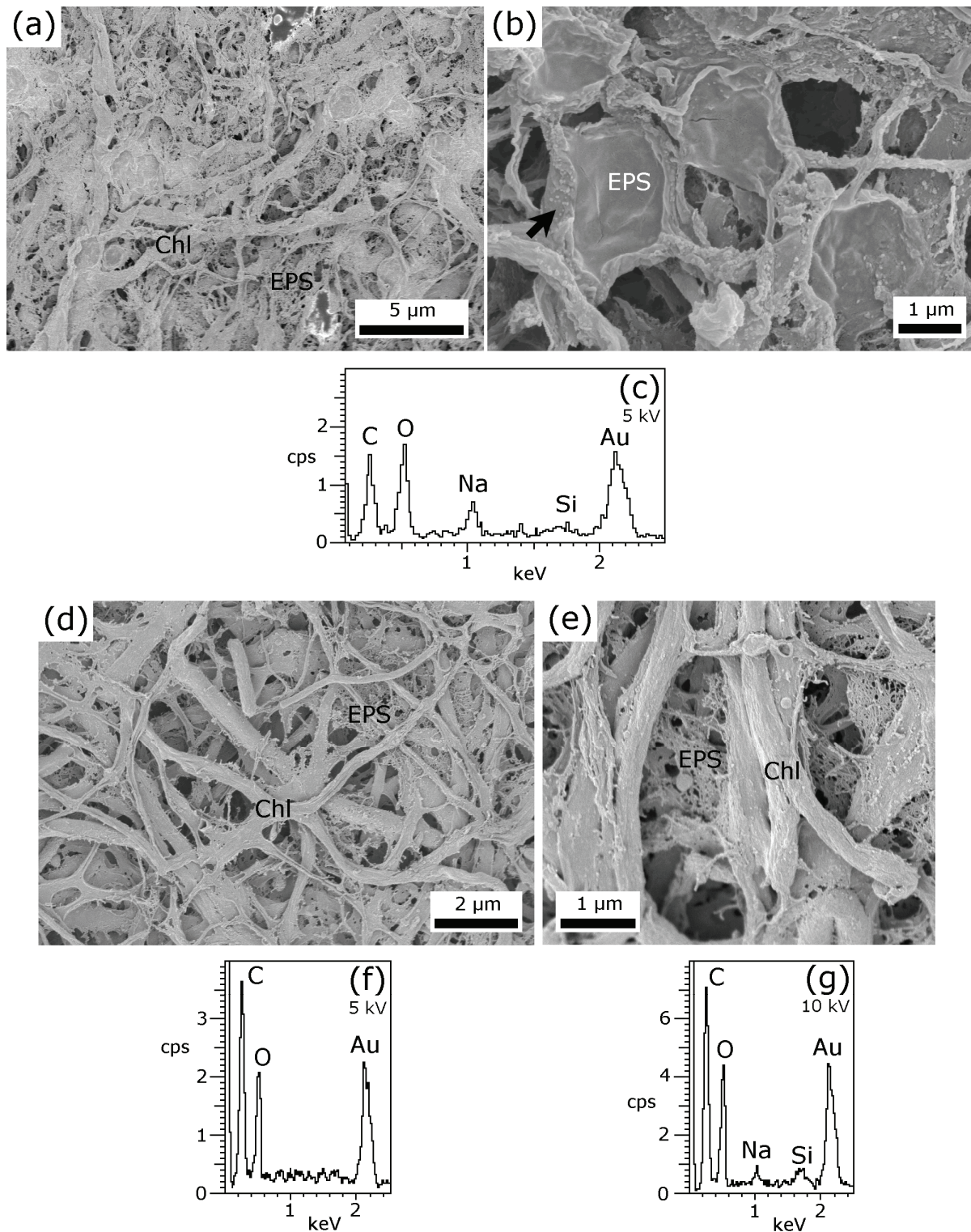


**Fig. 3-33 :** Aspect naturel du tapis à *Chloroflexus* du site n°2 : Micrographies MEB, avec le spectre EDX correspondant, et Cryo-MEB, montrant l'état naturel du tapis à *Chloroflexus* d'Octopus Spring prélevé au site n°2. **(a)** Vue d'ensemble du tapis, avec le spectre EDX correspondant **(c)**, obtenu à 5 kV sur une large zone du tapis. Le tapis présente des restes de filaments de *Chloroflexus* (Chl), et des bâtonnets. Les cellules sont liées ensemble par des EPS filamenteux (EPS). Noter le pic du silicium (Si) sur le spectre EDX. **(b)** Vue rapprochée sur le réseau d'EPS (EPS). Noter les grains de silice (flèche) précipité sur ces EPS. Un spirochète a fortement insisté pour être sur la photo. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 1 kV.



**Fig. 3-34 :** 2 semaines de fossilisation, tapis à *Chloroflexus* du site n°1 : Micrographies MEB, avec le spectre EDX correspondant, montrant le tapis à *Chloroflexus* du site n°2, exposé à une solution de silice à une concentration de 500 ppm pendant 2 semaines. **(a)** Vue d'ensemble du tapis, avec les spectres EDX correspondants **(b)** obtenus à 5kV sur une zone large du tapis, montrant des restes de filaments de *Chloroflexus*, et le réseau d'EPS (EPS). Noter l'aspect dense de l'échantillon et le faible pic du silicium (Si) sur le spectre EDX. **(c)** Vue rapprochée sur des restes de filaments de *Chloroflexus* (Chl). Des grains de silice (flèche) ont précipité sur la paroi cellulaire. **(d)** Vue rapprochée sur les EPS minéralisés (EPS). Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 1 kV.





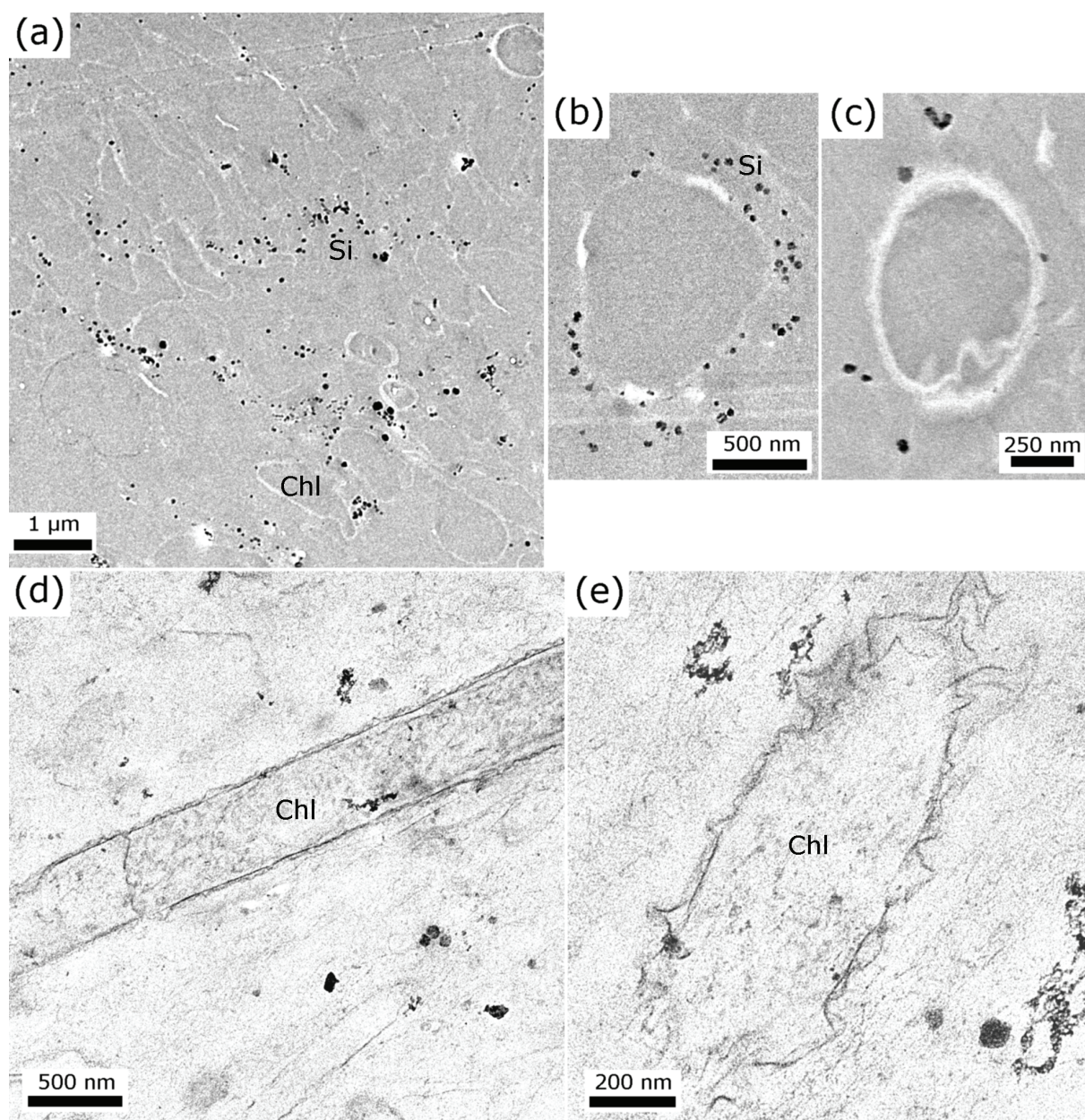
**Fig. 3-35 :** 5 mois de fossilisation, tapis à *Chloroflexus* des sites n°1 et n°2 : Micrographies MEB, avec le spectre EDX correspondant, montrant les tapis à *Chloroflexus* des sites n°1 et n°2, exposés à une solution de silice à une concentration de 500 ppm pendant 5 mois.

Site n°1 : (a) Vue d'ensemble du tapis, avec le spectre EDX correspondant (c) obtenu à 5 kV sur une zone large du tapis, montrant des restes de filaments de *Chloroflexus* (Chl) et le dense réseau d'EPS (EPS). Noter l'absence de pic du silicium (Si) sur le spectre EDX. (b) Vue rapprochée des EPS (EPS), montrant quelques signes de minéralisation (flèches).

Site n°2 : (d) Vue d'ensemble du tapis, avec les spectres EDX correspondants (f) et (g), obtenus sur une zone large du tapis, à 5 et 10 kV respectivement. Le tapis présente des restes de filaments de *Chloroflexus* (Chl), liés par un réseau d'EPS (EPS). Noter l'absence de pic du silicium sur le spectre EDX à 5 kV, et le faible pic présent à 10 kV. (e) Vue rapprochée sur les restes de filaments de *Chloroflexus* (Chl) et le réseau d'EPS (EPS). Noter la relative faible présence de grains de silice sur ces filaments et EPS.

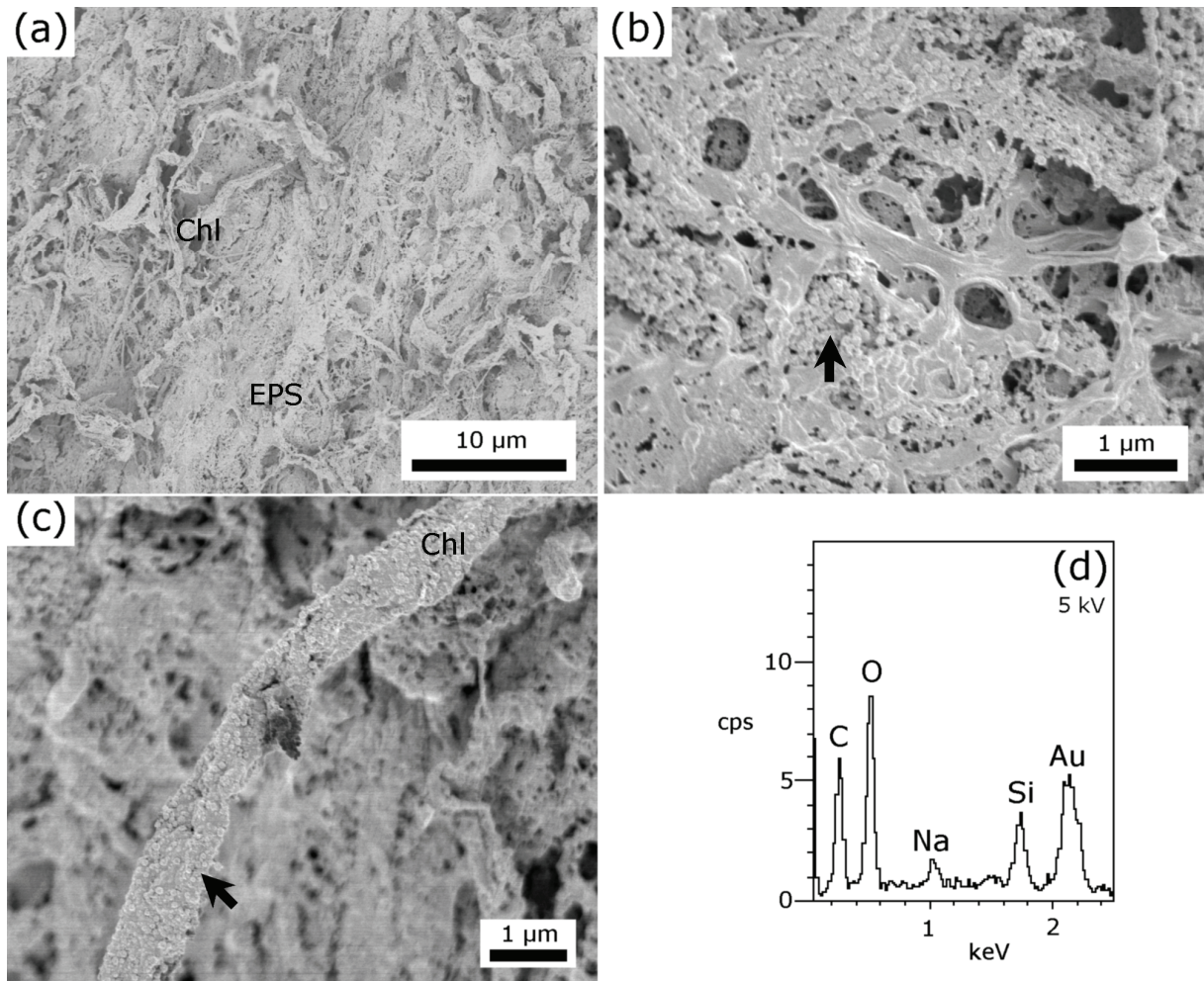
Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 1 kV.





**Fig. 3-36 :** 5 mois de fossilisation, tapis à *Chloroflexus* du site n°1 : Micrographies MET montrant des coupes du tapis à *Chloroflexus* du site n°1, exposé à une solution de silice à une concentration de 500 ppm pendant 5 mois. (a) Vue d'ensemble du tapis montrant essentiellement des gaines vides de *Chloroflexus* (Chl), ainsi les grains de silice (Si). Coupe non contrastée. (b) (c) Vue rapprochée sur les gaines vides de filaments de *Chloroflexus*. Quelques grains de silice (Si) sont présents dans l'entourage de ces gaines. Coupes non contrastées. (d) (e) Vues rapprochées de filaments de *Chloroflexus* (Chl). Le contenu du cytoplasme, ainsi que la structure de la paroi (très déformées en (e)) sont visibles. Coupes contrastées. Toutes les micrographies et les spectres EDX ont été obtenus à un voltage de 200 kV.





**Fig. 3-37 :** 1 an de fossilisation, tapis à *Chloroflexus* du site n°1 : Micrographies MEB, avec le spectre EDX correspondant, montrant le tapis à *Chloroflexus* du site n°1, exposé à une solution de silice à une concentration de 500 ppm pendant 1 an. **(a)** Vue d'ensemble du tapis, avec le spectre EDX correspondant **(e)** obtenu à 5 kV sur une zone large du tapis, montrant des restes de filaments de *Chloroflexus* (Chl) et le réseau d'EPS (EPS). Noter le pic du silicium (Si) sur le spectre EDX, ainsi que le pic du sodium (Na). **(b)** Vue rapprochée, montrant des structures filamenteuses (EPS ou restes de filaments) ainsi que des grains de silice (flèche) qui ont précipité sur ces structures. **(d)** Vue rapprochée sur un reste de filament de *Chloroflexus* (Chl). Noter la forte quantité de grains de silice (flèche) précipités sur ce filament. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 1 kV.

d'environ 2  $\mu\text{m}$  (Fig. 3-35b). Ces membranes ne montrent que de rares signes de minéralisation. De manière générale, tant sur les restes de filaments que sur les EPS, et tant sur le tapis du site n°1 que sur celui du site n°2, la minéralisation observée n'y est pas aussi marquée qu'après deux semaines de fossilisation (comparer la Fig. 3-35e (site n°2), avec les Fig. 3-34c et 3-34d ; respectivement filaments et EPS minéralisés du site n°1 après deux semaines). Les analyses EDX faites à 5kV sur l'ensemble des tapis des deux sites ne montrent aucun signal du silicium (Fig. 3-35c, site n°1 ; Fig. 3-35f, site n°2). Les spectres EDX obtenus à 10 kV montrent à peine un petit pic du silicium (Fig. 3-35g, site n°2), et des traces de sodium.

Les observations au MET sur des coupes non contrastées du tapis à *Chloroflexus* du site n°1 confirment la faible quantité de silice dans le tapis. Si des particules d'environ 50 nm sont bien présentes parmi les cellules (ou les restes de cellules) (Fig. 3-36a), leur nombre n'y est pas aussi important que dans le tapis à l'état naturel. On observe des accumulations de grains de silice autour de certains filaments (Fig. 3-36b), mais le nombre de grains est nettement inférieur à ce que l'on pouvait observer à l'état naturel (comparer avec la Fig. 3-32f).

Dans l'ensemble, à l'exception de quelques filaments, la plupart d'entre eux apparaissent comme vides d'après l'absence de tout contraste ou de structures internes visibles sur les coupes non contrastées (Fig. 3-36b, Fig. 3-36c). La paroi de ces cellules (ou restes de cellules) montre un contraste bien inférieur à celui de la résine, et apparaît donc blanche. Aucun contraste pouvant être attribué à une précipitation de silice sur cette paroi (cf. Fig. 3-30d, site n°3) n'a été repéré. Les coupes contrastées ont montré que certains filaments de *Chloroflexus* possédaient encore du matériel cytoplasmique, malgré des signes apparents de déformation au niveau de la paroi (Fig. 3-36d et 3-36e).

### **Après 1 an**

Après un an de fossilisation expérimentale, le tapis à *Chloroflexus* du site n°1 ne montre que peu de structures identifiables (Fig. 3-37a). Seuls quelques filaments de *Chloroflexus* très dégradés se distinguent du reste du tapis. Des structures lisses et allongées y côtoient des dépôts granuleux faits de particules de 50-100 nm de diamètre (Fig. 3-37b). Les analyses EDX du tapis obtenues à 5 kV, montrent un pic de silicium important qui suggère que ce dépôt est un précipité de silice (Fig. 3-37d). Les structures lisses précitées sont certainement des EPS ou des restes cellulaires non minéralisés. Ces granules de silice ont

également précipité en abondance à la surface de certains filaments de *Chloroflexus* lysés (Fig. 3-37c).

**Tableau 3-XIX : Bilan des observations faites MEB sur les filaments de *Chloroflexus*, lors de la fossilisation expérimentale du tapis microbien moribond prélevé au site n°1 à Octopus Spring.**

<b>MORPHOLOGIE</b>				
<b>Temps d'exposition</b>	<b>Aspects généraux</b>	<b>Préservation de la paroi</b>	<b>Cytoplasme</b>	<b>EPS</b>
<i>Etat naturel</i>	Filaments vides	Seule la gaine fibreuse est présente la plupart du temps	Absent	Importance matrice d'EPS. Structure alvéolaire, en réseau
<i>2 semaines</i>	Filaments vides, vus torsadés au MEB	-	-	Structure en réseau
<i>5 mois</i>	Filaments vides	Seule la gaine fibreuse est présente la plupart du temps. Quelques restes de paroi dans certains cas.	Absent la plupart du temps. Encore présent dans quelques cas.	Structure en réseau et en feuillets
<i>1 an</i>	Filaments vides, plus ou moins dégradés	-	-	Aspect désordonné. Peu de traces d'une structure en réseau

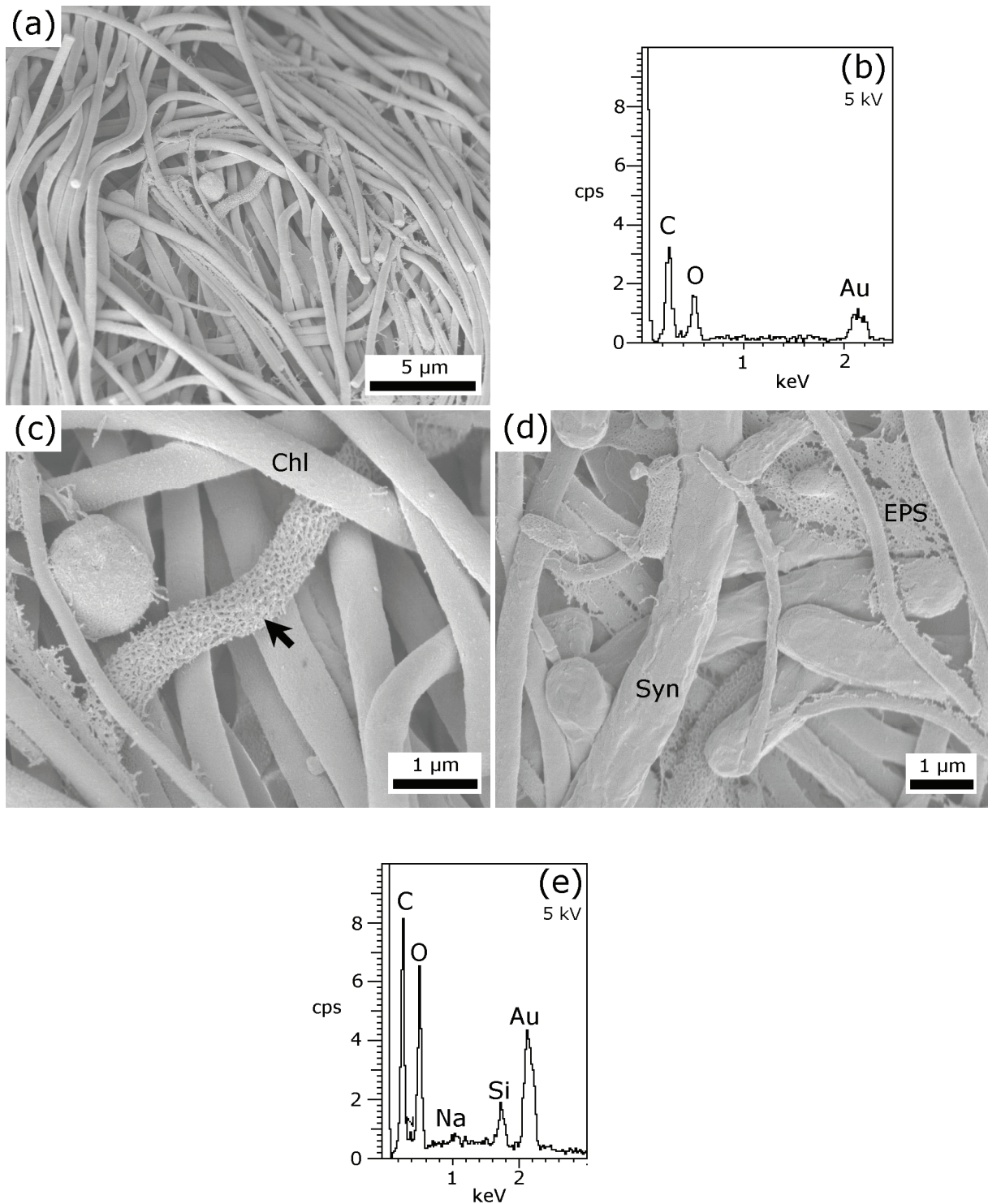
  

<b>SILICIFICATION</b>				
<b>Temps d'exposition</b>	<b>Gaine</b>	<b>EPS</b>	<b>Degré relatif de silicification</b>	<b>EDX / Signal de la silice</b>
<i>Etat naturel</i>	Nombreuses particules de silice naturelle accumulées sur les gaines	Quelques particules de silice présentes	Relativement important	Léger
<i>2 semaines</i>	-	Minéralisation parfois forte	Relativement important	Léger
<i>5 mois</i>	Très peu de particules de silice naturelle accumulées sur les gaines	Minéralisation quasi-nulle	Très faible	Nul
<i>1 an</i>	-	Forte minéralisation	Homogène Relativement important	Important

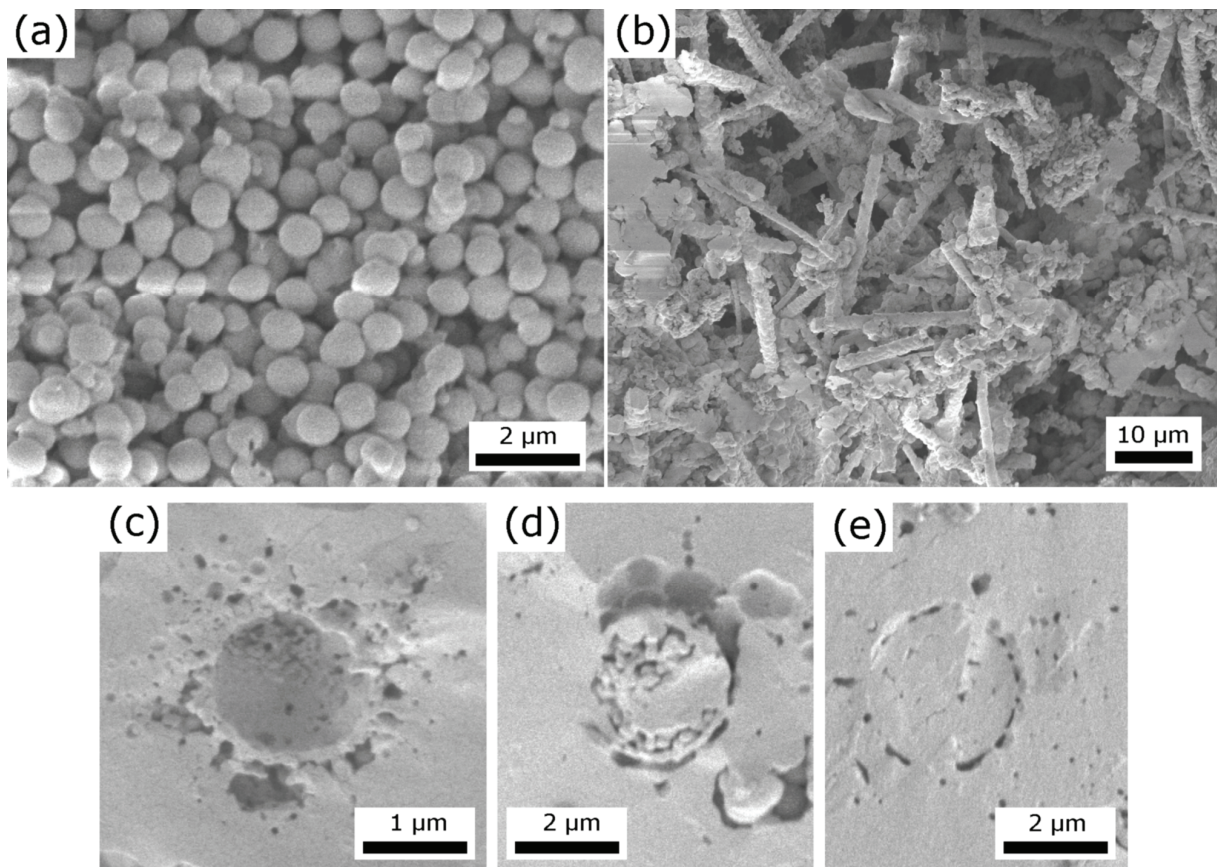
### 3.5.3.3. Aspect naturel et fossilisation du tapis à *Synechococcus* du site n°1

Les prélèvements de tapis microbiens ayant été bouleversés par le transport, il était impossible a posteriori de déterminer quelle était la profondeur originelle des parties étudiées du tapis à *Chloroflexus* (rouge). Le tapis à *Synechococcus* (vert) en revanche était parfaitement identifiable, et sa localisation en surface était évidente.





**Fig. 3-38 :** Aspect naturel du tapis à *Synechococcus* du site n°1 à l'état naturel et après 5 mois de fossilisation : Micrographies MEB, avec le spectre EDX correspondant, montrant le tapis à *Synechococcus* d'Octopus Spring prélevé au site n°1, à l'état naturel et exposé à une solution de silice à une concentration de 500 ppm pendant 5 mois. Etat naturel : (a) Vue d'ensemble du tapis, montrant une forte quantité de filaments de *Chloroflexus*, parmi quelques coques. Le spectre EDX correspondant (b) a été obtenu sur une zone large du tapis à 5 kV. Noter l'absence de pic du silicium sur ce spectre. (c) Vue rapprochée sur les filaments de *Chloroflexus* (Chl). Noter la gaine d'EPS (flèche) qui entoure parfois les filaments. (d) Vue rapprochée sur des bâtonnets de *Synechococcus* (Syn). Noter les EPS filamenteux (EPS), présents entre les cellules. 5 mois de fossilisation : (e) Spectre EDX obtenu sur une zone large du tapis à 5 kV. En raison d'un problème survenu lors de la préparation de l'échantillon, les micrographies MEB n'ont rien montré de concluant dans ce cas. Toutes les micrographies ont été obtenues à un voltage de 1 kV.



**Fig. 3-39 :** *Sinter* : Micrographies MEB, montrant l'aspect d'une formation siliceuse (*siliceous sinter*), prélevée en bordure d'une source chaude du Parc National de Yellowstone. **(a)** Vue d'ensemble, montrant des restes de micro-organismes filamenteux recouverts par des sphérules de silice. **(b)** Vue rapprochées sur les sphérules de silice. **(c) (d) (e)** Etapes successives de la minéralisation des filaments, avec minéralisation de la paroi et de l'extérieur, minéralisation de l'intérieur du filament, et finalement, minéralisation complète.

Confirmant ce qui avait été vu en microscopie optique, le MEB a montré que cette zone du tapis était également dominée par des filaments de *Chloroflexus* (Fig. 3-28a). Seuls quelques bâtonnets de *Synechococcus* ont été repérés (Fig. 3-28d). Les filaments sont en parfait état et, par endroits, enveloppés dans une couche d'EPS maillé (Fig. 3-28c). Sur ce tapis, les analyses EDX faites à 5 kV n'ont pas révélé de présence de silicium (Fig. 3-28b).

Un problème survenu lors de la préparation des échantillons nous a privé d'images prises au MEB pour le tapis à *Synechococcus* du site n°1 fossilisé pendant 5 mois. Il a toutefois été possible de faire des analyses EDX. Contrairement à ce même tapis à l'état naturel (Fig. 3-38b), ou au tapis à *Chloroflexus* après la même durée de fossilisation (3-35c), ces analyses ont montré un important pic du silicium (Fig. 3-38e).

### **3.5.4. Sinter**

Différentes structures ont été identifiées en microscopie électronique dans une concrétion siliceuse (ou *sinter*) prélevée en bordure d'une source chaude de Yellowstone.

D'une part, ce *sinter* était constitué de sphères de silice particulièrement uniformes en taille (700-800  $\mu\text{m}$  de diamètre, Fig. 3-39a). Ces sphères étaient plus ou moins fusionnées selon les endroits, pouvant ainsi former des amas de silice boursoufflés. D'autre part, de nombreuses structures filamenteuses étaient visibles (Fig. 3-39b), sans doute les restes de micro-organismes préservés par silicification. Il est impossible de savoir de quelle espèce il pouvait d'agir. Les filaments ont un diamètre de 1-2  $\mu\text{m}$  (Figs. 3-39a, b et c), supérieur à celui des filaments de *Chloroflexus*. De nombreuses sections de filaments ont été vues dans le *sinter*, avec des aspects différents (Figs. 3-39a, b et c). Si les structures cellulaires sont identifiables (notamment la paroi), les images MEB ne montrent rien qui pourrait être interprété comme étant des restes cellulaires.

### 3.6. Devenir de la matière organique durant de la fossilisation expérimentale de *M. jannaschii*

#### 3.6.1. Remarques préliminaires

Afin de mieux saisir le sens des résultats présentés ci-après, il convient de préciser l'origine et la composition du lyophilisat analysé. Les échantillons sont issus d'une culture de 500 mL de *M. jannaschii*. Une tentative de mesure de la quantité de cellules dans un flacon de culture a donné 8,9 mg de cellules pour 500 mL de culture. Mais ce résultat est sans doute sous-estimé (cf. paragraphe 3.1.2.). En effet, la littérature parle en effet plutôt de centaines de mg/L (Mukhopadhyay *et al.*, 1999). Par conséquent, le chiffre exact se situait certainement entre 10 et 100 mg de cellules dans 500 mL de culture (estimation large). En ce qui concerne la silice, les 0,9 mL de solution de silice pure qui ont été injectés dans chaque flacon de culture pour lancer la fossilisation expérimentale, correspondent à 340 mg de silice. Nous avons vu qu'un précipité de silice blanchâtre s'était alors rapidement formé et avait décanté au fond des flacons. Finalement, les lyophilisats ont été préparés en centrifugeant l'ensemble de la culture et en ne gardant que 50 à 100 mL de milieu originel. En première approximation, on peut donc supposer que l'ensemble de la silice a précipité et que le volume lyophilisé contient le précipité de silice ainsi que les cellules. Par ailleurs, il convient aussi de rappeler que le milieu de culture de *M. jannaschii* contient initialement environ 30 g de sels par litre (dont 25g de NaCl). Le culot à partir duquel le lyophilisat est obtenu contient donc entre 1,5 et 3 g de sels.

La composition finale du lyophilisat obtenu à partir d'une culture est résumée dans le tableau 3-XX suivant :

**Tableau 3-XX : Estimation de la composition finale du lyophilisat obtenu à partir de 500 mL de culture de *M. jannaschii*.**

<i>Sels du milieu de culture</i>	1,5 – 3 g
<i>Silice (sauf dans le cas de cultures non fossilisées)</i>	0,340 g
<i>Cellules</i>	0,01 – 0,1 g

Ainsi, les principaux constituants du lyophilisat sont les sels du milieu de culture, la silice ne représentant que 10-20 % du total. De même, dans l'hypothèse optimiste de 100 mg

de cellules dans 500 mL de culture, on arrive une estimation de 3% maximum de cellules dans le lyophilisat.

Ce calcul montre qu'il n'y a pas de différences notoires à attendre entre les échantillons soumis à la fossilisation et les autres (échantillons « *Etat naturel* »). Dans la même logique, d'éventuelles fluctuations de la quantité de silice précipitée n'auront que peu d'influence sur la masse finale du lyophilisat, et donc sur sa concentration en matière organique (les résultats des analyses des molécules organiques sont exprimées en mg ou µg par g de lyophilisat).

La méthode de préparation du lyophilisat peut être mise en cause dans certains cas. En effet, après la centrifugation, une petite quantité de milieu (entre 50 et 100 mL) est conservée pour la lyophilisation. Toutefois cette quantité a pu varier selon les échantillons, et donc entraîner des quantités variables de sels dans le lyophilisat. Au final, il est possible que cela ait pu entraîner de petites variations dans la concentration en matière organique des échantillons.

Enfin, des problèmes de pesée des échantillons ont été rencontrés avec les échantillons de cellules et EPS de *M. jannaschii*, conservés dans l'éthanol absolu. En effet, il n'a pas été possible déterminer avec précision la masse, très faible, de matière sèche utilisée pour les analyses. Ainsi, dans le meilleur des cas, les pesées effectuées après évaporation de l'éthanol absolu ne fournissaient que des valeurs de quelques milligrammes, souvent entachées d'erreurs (par exemple un poids de tube « plein » inférieur au poids de tube « vide »).

### **3.6.2. Analyse des acides aminés durant la fossilisation de *M. jannaschii***

La plupart des analyses d'acides aminés ont été réalisées sur des lyophilisats de cultures silicifiées pendant des durées diverses. Seules les compositions respectives des cellules et EPS de *M. jannaschii* ont été déterminées sur des échantillons conservés dans l'éthanol absolu, après extraction.

En raison d'un pic parasite, l'arginine n'a pas pu être mesurée sur les échantillons lyophilisés. Par conséquent, lors de la comparaison des résultats des échantillons lyophilisés avec ceux conservés dans l'éthanol, les compositions de ces derniers ont été recalculées, sans prendre l'arginine en compte.

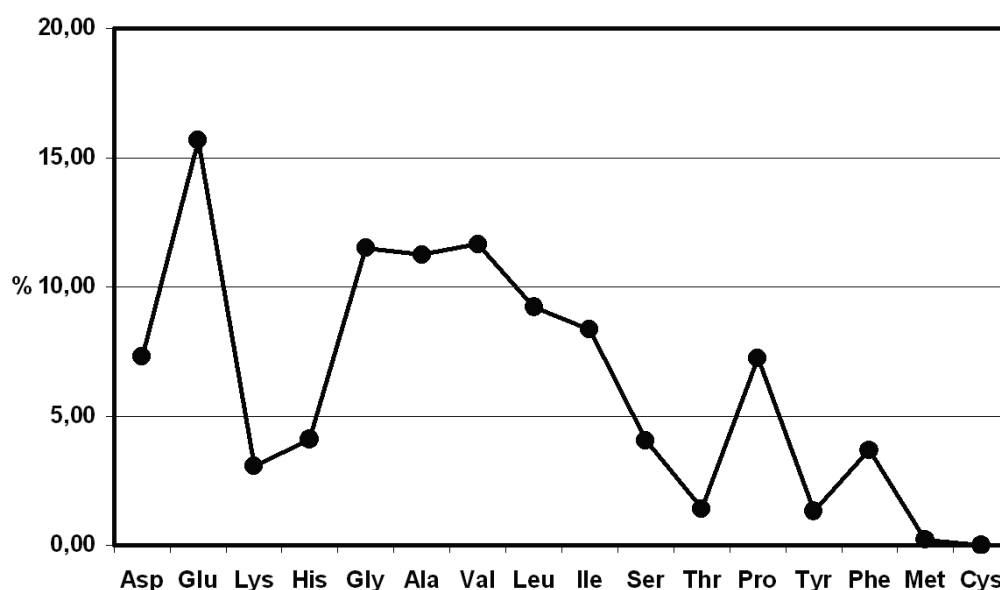


### 3.6.2.1. Composition en acides aminés d'une culture non fossilisée

Le tableau 3-XXI ci-après présente la composition en acides aminés d'une culture lyophilisée à la fin de la phase exponentielle de croissance, ainsi les compositions respectives des EPS et des cellules, séparés en fin de culture et conservés dans de l'éthanol absolu.

**Tableau 3-XXI : Composition en acides aminés (exprimée en % du total) d'une culture lyophilisée de *M. jannaschii*, ainsi que les compositions respectives des cellules et EPS.**

	Culture totale	Cellules	EPS
<i>Asp</i>	7,28	17,44	6,01
<i>Glu</i>	15,66	16,78	1,50
<i>Lys</i>	3,05	4,05	4,62
<i>Arg</i>	n.d.	4,56	3,04
<i>His</i>	4,10	5,51	4,92
<i>Gly</i>	11,51	9,44	8,16
<i>Ala</i>	11,25	10,06	10,76
<i>Val</i>	11,64	6,68	14,26
<i>Leu</i>	9,21	5,65	10,79
<i>Ile</i>	8,36	4,90	11,37
<i>Ser</i>	4,06	5,17	3,81
<i>Thr</i>	1,41	1,49	0,39
<i>Pro</i>	7,25	4,78	10,37
<i>Tyr</i>	1,33	1,14	2,17
<i>Phe</i>	3,69	2,17	5,30
<i>Met</i>	0,21	0,18	2,52
<i>Cys</i>	0,00	0,00	0,00



**Fig. 3-40 : Composition en acides aminés (exprimés en % du total d'acides aminés) d'une culture de *M. jannaschii*.**

Dans l'ensemble, la culture de *M. jannaschii* présente plus d'acides aminés dicarboxyliques (Asp, Glu) que basiques (Lys, His) (Fig. 3-40). Les acides aminés neutres sont présents en quantité, avec une majorité des plus légers (Gly, Ala, Val). La proline est également présente en quantité (Fig. 3-40).

La comparaison des compositions spécifiques des cellules et des EPS permet de mettre en évidence une distribution différente des acides aminés (Fig. 3-41). Ainsi, les cellules présentent nettement plus de d'acides aminés dicarboxyliques (Asp, Glu) et sensiblement plus d'hydroxylés (Ser, Thr) que les EPS. A l'inverse ces derniers sont enrichis en acides aminés neutres (notamment les plus lourds : Val, Leu, Ile), ainsi qu'en proline, phénylalanine et méthionine.

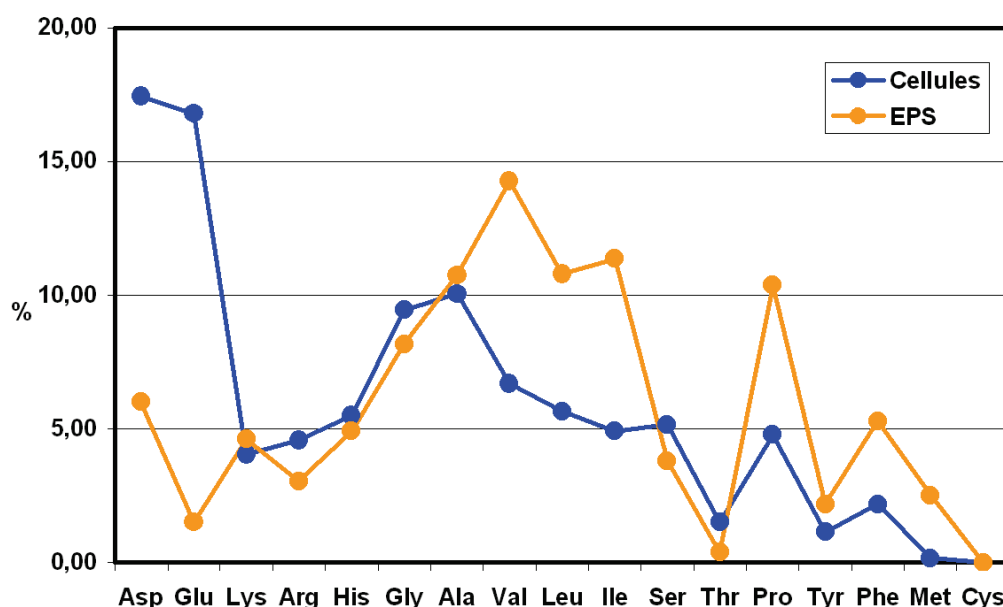


Fig. 3-41 : Composition spécifique (exprimée en % du total d'acides aminés) des cellules et EPS de *M. jannaschii*.

De manière générale, on constate que, pour la plupart des acides aminés, la composition de la culture entière se présente a priori bien comme une moyenne des compositions, différentes, des cellules et des EPS (Fig. 3-42). Ce résultat montre aussi la cohérence des mesures, malgré la différence de conservation des échantillons, lyophilisés ou conservés dans l'éthanol absolu.

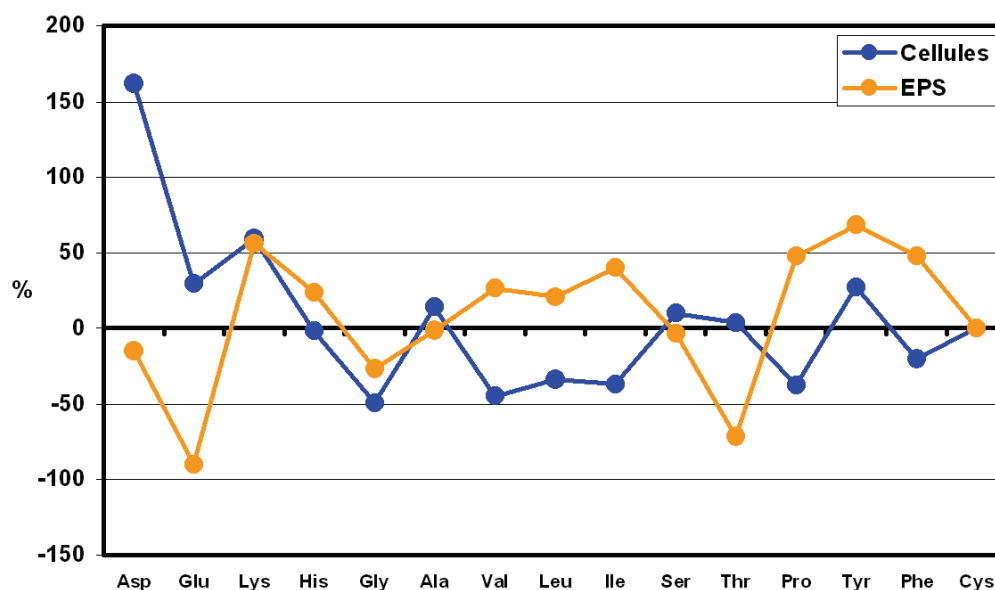


Fig. 3-42 : Ecart (en %) des compositions en acides aminés respectives des cellules et EPS de *M. jannaschii* par rapport à la composition de l'ensemble de la culture. A noter que, puisque l'arginine n'a pu être mesurée sur l'échantillon lyophilisé de la culture totale, les pourcentages des compositions des cellules et EPS ont été recalculés sans tenir compte de cet acide aminé.

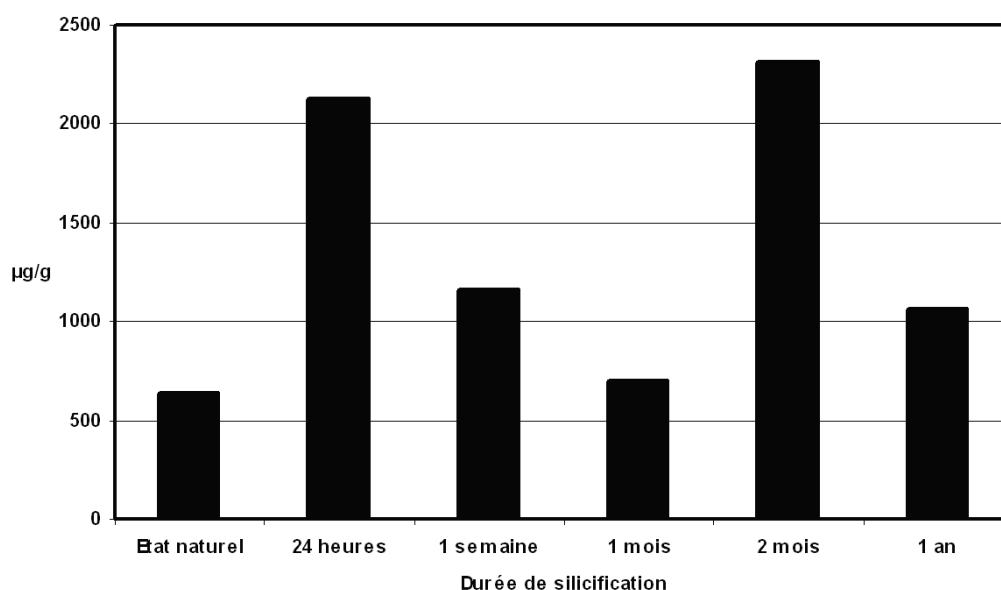
### 3.6.2.2. Evolution de la composition en acides aminés au cours de la fossilisation

#### Evolution des masses totales d'acides aminés analysés tout au long de la fossilisation expérimentale

Le Tableau 3-XXII et la Fig. 3-43 présentent l'évolution des masses totales d'acides aminés durant la fossilisation de cultures de *M. jannaschii* pendant des durées diverses.

Tableau 3-XXII : Evolution des masses totales d'acides aminés analysés (exprimées en  $\mu\text{g}$  par g de lyophilisat) durant la fossilisation expérimentale de *M. jannaschii*.

	Etat naturel	24 heures	1 semaine	1 mois	2 mois	1 an
$\mu\text{g/g}$	640,51	2130,60	1162,68	700,41	2311,04	1067,91



**Fig. 3-43 : Evolution des masses totales d'acides aminés analysés (exprimées en µg par g de lyophilisat) au cours de la fossilisation expérimentale de *M. jannaschii*.**

24 heures après l'injection de la silice dans les cultures, la quantité totale d'acides aminés analysés est plus de trois fois supérieure à celle de la culture. Cette quantité baisse ensuite fortement jusqu'à 1 mois de fossilisation, où elle retrouve son niveau originel. Cependant, après deux mois de silicification, on note à nouveau une très forte quantité d'acides aminés, comparable avec celle analysée après 24 heures. Le fait que les quantités mesurées après 1 mois et 1 an de fossilisation soient semblables, et le fait que les observations en microscopie électronique n'aient montré aucun bouleversement majeur pendant cette période nous invitent à considérer que le pic à 2 mois puisse être dû à un artefact expérimental ou à une hétérogénéité de l'échantillon.

Le Tableau 3-XXIII présente les compositions en acides aminés à différentes étapes de la fossilisation expérimentale.

**Tableau 3-XXIII : Composition en acides aminés (exprimées respectivement en µg par g de lyophilisat, et en % du total) des cultures de *M. jannaschii* au cours de la fossilisation.**

	Etat naturel		24 heures		1 semaine		1 mois		2 mois		1 an	
	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%
<i>Asp</i>	49,01	7,28	115,15	5,40	33,22	2,86	44,98	6,42	110,89	4,80	81,97	7,27
<i>Glu</i>	116,48	15,66	242,33	11,37	95,93	8,25	78,36	11,19	262,21	11,35	174,65	14,01
<i>Lys</i>	22,52	3,05	207,04	9,72	82,17	7,07	38,29	5,47	199,35	8,63	32,12	2,59
<i>Arg</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>His</i>	18,46	4,10	113,18	5,31	54,11	4,65	28,54	4,08	106,53	4,61	30,80	4,08
<i>Gly</i>	43,67	11,51	187,93	8,82	169,25	14,56	59,03	8,43	228,73	9,90	70,28	11,05
<i>Ala</i>	88,19	11,25	228,25	10,71	123,56	10,63	83,74	11,96	249,89	10,81	144,22	10,97
<i>Val</i>	68,90	11,64	244,87	11,49	128,66	11,07	81,75	11,67	258,94	11,20	132,20	13,32
<i>Leu</i>	61,06	9,21	222,60	10,45	128,07	11,01	76,70	10,95	228,06	9,87	105,33	9,48
<i>Ile</i>	55,41	8,36	205,13	9,63	97,35	8,37	66,44	9,49	218,95	9,47	99,74	8,98
<i>Ser</i>	21,57	4,06	94,91	4,45	98,80	8,50	33,44	4,77	100,41	4,34	31,05	3,49
<i>Thr</i>	8,47	1,41	0,00	0,00	2,36	0,20	6,63	0,95	5,94	0,26	13,01	1,29
<i>Pro</i>	42,17	7,25	150,58	7,07	82,05	7,06	59,92	8,55	227,61	9,85	84,55	8,67
<i>Tyr</i>	12,19	1,33	26,89	1,26	23,27	2,00	14,86	2,12	23,83	1,03	13,70	0,89
<i>Phe</i>	30,82	3,69	90,38	4,24	42,17	3,63	26,27	3,75	89,70	3,88	50,55	3,61
<i>Met</i>	1,59	0,21	0,54	0,03	1,72	0,15	1,46	0,21	0,00	0,00	3,74	0,30
<i>Cys</i>	0,00	0,00	0,82	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>	<b>640,51</b>	<b>100,00</b>	<b>2130,60</b>	<b>100,00</b>	<b>1162,68</b>	<b>100,00</b>	<b>700,41</b>	<b>100,00</b>	<b>2311,04</b>	<b>100,00</b>	<b>1067,91</b>	<b>100,00</b>

### Conséquence de l'ajout de silice

L'ajout de la solution de silice dans le milieu de culture a modifié les conditions du milieu où se trouvaient les micro-organismes : ils ont dû faire face à une hausse du pH de 6,8 à 7,8 ainsi qu'une saturation du milieu aqueux en silice. L'étude de la composition en acides aminés de l'échantillon 24 heures après l'ajout de la silice permet de juger des conséquences de cet ajout de silice sur le plan chimique.

Ainsi après l'ajout de la silice et 24 heures de fossilisation, la quantité totale d'acides aminés analysés a été multipliée par trois (Tableau 3-XXII et Fig. 3-43). Cette forte hausse se traduit par une nette baisse des proportions des acides aminés dicarboxyliques (*Asp*, *Glu*) et une hausse des basiques (*Lys*, *His*), notamment de la lysine. En ce qui concerne les neutres, les plus légers (*Gly*, *Ala*) diminuent, et les plus lourds (*Leu*, *Ile*) augmentent. En position médiane, la valine (*Val*) reste stable. Les proportions des autres acides aminés demeurent a priori stables, à l'exception de la thréonine (*Thr*) qui a disparue (Fig. 3-44).



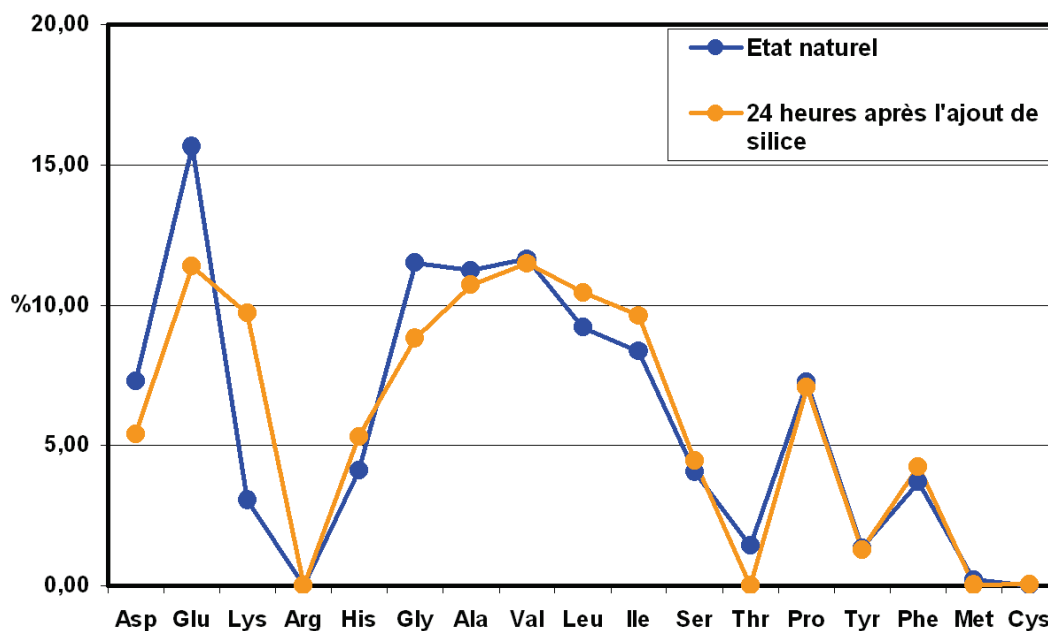


Fig. 3-44 : Compositions en acides aminés (exprimées en % du total d'acides aminés) des cultures de *M. jannaschii* à l'état naturel, et 24 heures après l'injection de la silice.

### *Suivi des différentes catégories d'acides aminés au cours de la fossilisation expérimentale*

Les évolutions des pourcentages des acides aminés, répartis par catégories (acides, basiques, neutres, et autres) sont présentées dans la Fig. 3-45.

Les acides aminés basiques et dicarboxyliques présentent des tendances communes dans leur catégorie (Figs. 3-45a et b). Les proportions des acides aminés dicarboxyliques (Asp, Glu) baissent pendant la première semaine de fossilisation (qui correspond à la période où des cellules étaient encore présentes), avant d'augmenter par la suite. Les basiques (Lys, His), quant à eux, baissent progressivement lors du premier mois de la fossilisation, après une augmentation consécutive à l'injection de la silice. Cette évolution est très marquée pour la lysine. Un pic est observé après 2 mois de fossilisation avant une nouvelle baisse constatée au bout d'un an.

Hormis la glycine (Gly), les pourcentages des neutres ne présentent pas de variations importantes, et restent à peu près stables tout au long de la fossilisation (Fig. 3-45c). La glycine et la sérine présentent des évolutions nettement distinctes des autres composés avec notamment un pic important, après une semaine de fossilisation (Figs. 3-45c et d).

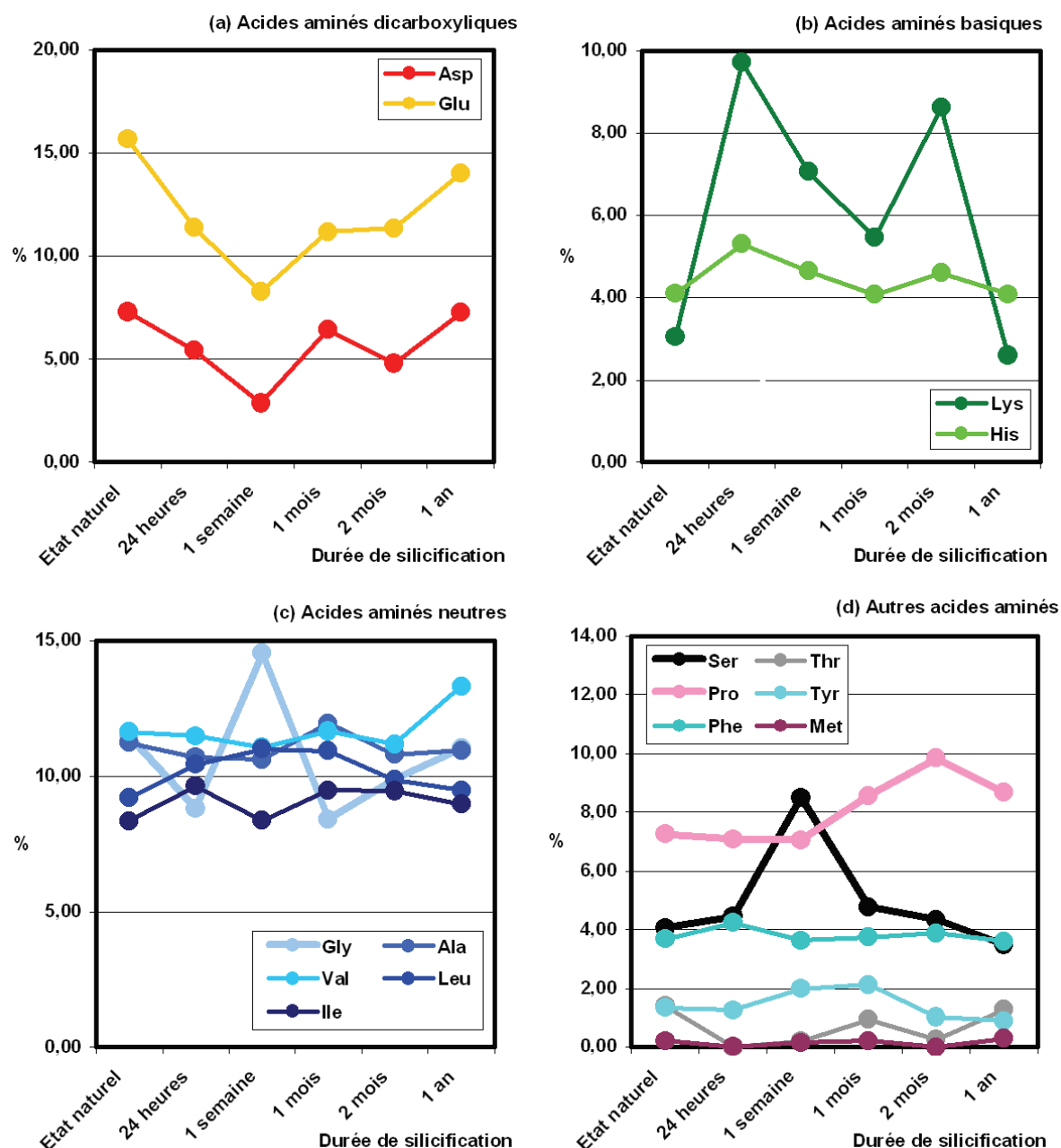


Fig. 3-45 : Evolution des proportions des différents acides aminés au cours de la fossilisation expérimentale. (a) dicarboxyliques, (b) basiques, (c) neutres, (d) autres.

Quant aux autres acides aminés, la plupart restent stables (Phe) ou sont présents en quantités trop faibles pour présenter une évolution significative (Thr, Met). Seule la proline se distingue et présente une évolution originale : après être restée stable durant une semaine de fossilisation, elle augmente doucement ensuite (Fig. 3-45d).

**Comparaison entre le précipité de silice et le surnageant récupérés au terme de la fossilisation expérimentale**

Au bout d'un an de fossilisation expérimentale, le précipité de silice formait un dépôt compact au fond des flacons. Il a été lyophilisé comme à l'habitude (« *Précipité* »), mais cette fois, le reste du milieu de culture, ordinairement non conservé après centrifugation a été également lyophilisé (« *Surnageant* »).

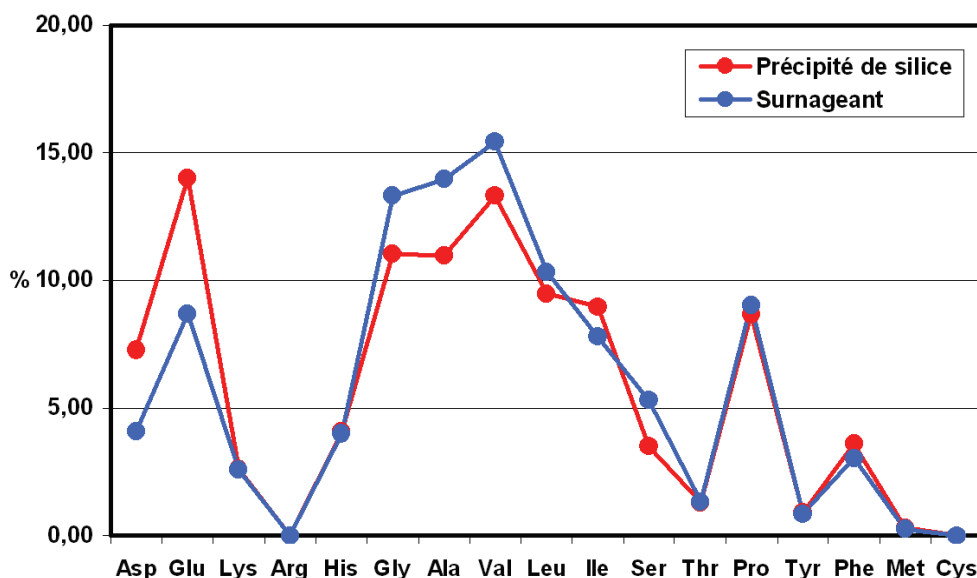
**Tableau 3-XXIV : Masses totales d'acides aminés analysés, après un an de fossilisation expérimentale, du précipité de silice et du surnageant d'une culture de *M. jannaschii*.**

	Précipité	Surnageant
<i>µg/g</i>	1067,91	376,78

**Tableau 3-XXV : Compositions en acides aminés (exprimée en % du total d'acides aminés extraits) du précipité de silice formé dans les cultures de *M. jannaschii* après un an de fossilisation expérimentale, ainsi que du surnageant correspondant.**

	Précipité	Surnageant
<i>Asp</i>	7,27	4,09
<i>Glu</i>	14,01	8,69
<i>Lys</i>	2,59	2,57
<i>Arg</i>	n.d.	n.d.
<i>His</i>	4,08	3,99
<i>Gly</i>	11,05	13,32
<i>Ala</i>	10,97	13,98
<i>Val</i>	13,32	15,43
<i>Leu</i>	9,48	10,33
<i>Ile</i>	8,98	7,79
<i>Ser</i>	3,49	5,30
<i>Thr</i>	1,29	1,32
<i>Pro</i>	8,67	9,03
<i>Tyr</i>	0,89	0,85
<i>Phe</i>	3,61	3,04
<i>Met</i>	0,30	0,27
<i>Cys</i>	0,00	0,00

Une comparaison des masses totales d'acides aminés analysés (Tableau 3-XXIV) montre, d'une part, qu'une grande quantité était encore présente (et donc préservée) dans le précipité, mais qu'également une quantité importante était toujours présente dans le surnageant.



**Fig. 3-46 :** Compositions en acides aminés (exprimée en % du total d'acides aminés extraits) du précipité de silice formé dans les cultures de *M. jannaschii* après un an de fossilisation expérimentale, ainsi que du surnageant.

Ainsi les acides aminés dicarboxyliques (Asp, Glu) sont davantage présents dans le précipité (Fig. 3-46), les aromatiques (Tyr, Phe) également, mais dans une moindre mesure. Les basiques (Lys, His) se répartissent de manière égale entre les deux. A l'exception de l'isoleucine (Ile) qui se retrouve préférentiellement dans le précipité, les neutres (Gly, Ala, Val, Leu) se retrouvent plutôt dans le surnageant, de même que la sérine (Ser).

### ***Comparaison des compositions en acides aminés au début et au terme de la fossilisation expérimentale***

Une comparaison entre les compositions en acides aminés dans la culture d'origine et après 1 an de fossilisation, permet de faire un bilan de la fossilisation.

La quantité d'acides aminés restants au final dans le précipité de silice représente presque le double de ce qui était présent dans la culture à l'état naturel (Tableau 3-XXII). Les compositions au début et au terme de la fossilisation expérimentale sont, à peu de choses près, identiques (Fig. 3-47).

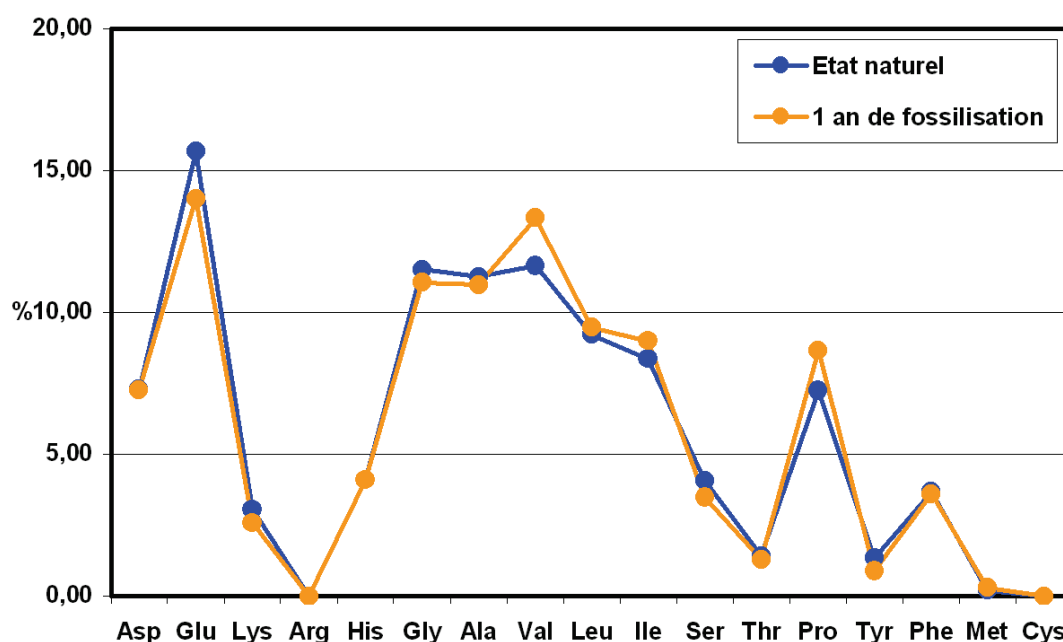


Fig. 3-47 : Compositions en acides aminés (exprimée en % du total d'acides aminés extraits) du précipité de silice formé dans les cultures de *M. jannaschii* à l'état naturel et après 1 an de fossilisation expérimentale.

### 3.6.3. Analyses des sucres durant la fossilisation de *M. jannaschii*

#### 3.6.3.1. Composition en sucres d'une culture de *M. jannaschii*

Les sucres ont été analysés sur des échantillons lyophilisés de cultures de *M. jannaschii*, en fin de culture (sans fossilisation), et après silicification pendant des durées allant de 24 heures à 1 an. Les EPS et cellules n'ont pas été analysés séparément. Les résultats de ces analyses sont présentés dans les tableaux ci-après.

Tableau 3-XXVI : Composition en sucres (en µg par g de lyophilisat) dans les échantillons au cours de la fossilisation de *M. jannaschii*

Sucres	Etat naturel	Durée de la fossilisation expérimentale					
		24 heures	1 semaine	1 mois	2 mois	1 an	
		précipité	précipité	précipité	précipité	précipité	surageant
<i>Mannose</i>	14	25	n.d.	9	6	-	n.d.
<i>Allose</i>	13	-	n.d.	4	-	-	n.d.
<i>Galactose</i>	9	-	n.d.	-	-	-	n.d.
<i>Glucose</i>	126	343	n.d.	42	83	53	n.d.
<b>Total</b>	161	367	n.d.	54	90	53	n.d.

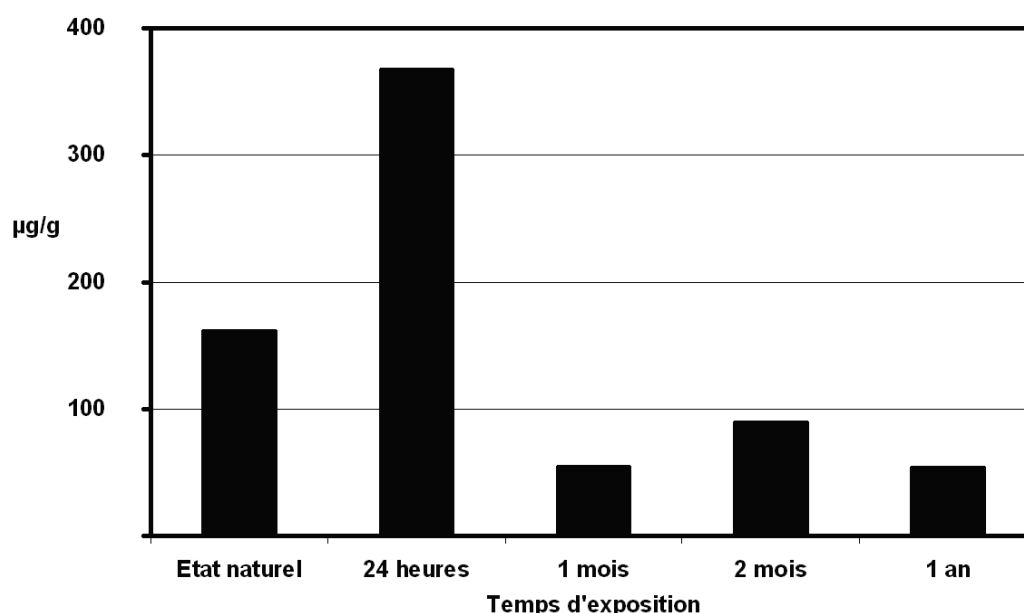


**Tableau 3-XXVII : Composition en sucres (en % du total de sucres analysés) dans les échantillons au cours de la fossilisation de *M. jannaschii***

Sucres	Etat naturel	Durée de la fossilisation expérimentale					
		24 heures	1 semaine	1 mois	2 mois	1 an	
		précipité	précipité	précipité	précipité	précipité	surageant
<i>Mannose</i>	9	7	n.d.	16	7	-	n.d.
<i>Allose</i>	8	-	n.d.	7	-	-	n.d.
<i>Galactose</i>	5	-	n.d.	-	-	-	n.d.
<i>Glucose</i>	78	93	n.d.	77	93	100	n.d.

L'analyse d'une culture non fossilisée a montré la présence de quatre composés, uniquement des aldohexoses : le mannose, l'allose, le galactose et le glucose, ce dernier étant largement prédominant (78 % du total). Ni le fucose et le rhamnose (désoxyhexoses), ni le xylose et l'arabinose (aldopentoses), ni même le ribose – qui est un cétopentose réputé « microbien » chez les géochimistes essentiellement du fait de sa présence dans la composition de l'ARN – n'ont été détectés.

### 3.6.3.2. Evolution des masses totales de monosaccharides analysés durant la fossilisation expérimentale.



**Fig. 3-48 : Masses totales de sucres analysés dans les échantillons lyophilisés un fin de culture et au cours de la fossilisation.**

Comme observé pour les acides aminés, la quantité totale de sucres dans l'échantillon a plus que doublé 24 heures après l'injection de la silice dans le milieu. Après un mois de fossilisation, ce total a à l'inverse fortement baissé, pour se stabiliser ensuite (Fig. 3-48). Si une partie de ces variations peut-être imputée à des artefacts expérimentaux ou à une hétérogénéité des échantillons, elles témoignent malgré tout de l'apparition de composés riches en sucres dans les 24 heures qui ont suivi l'injection de la silice. Par la suite, ces composés ont rapidement disparu.

### 3.6.3.3. Suivi du glucose et du mannose au cours de la fossilisation expérimentale

Seuls le mannose et le galactose ont pu être suivis au cours de la fossilisation (Fig. 3-49). Les autres sucres n'ont en effet pas été détectés dans les échantillons fossilisés, hormis quelques traces d'allose, un mois après le début de la fossilisation (Tableau XXVI).

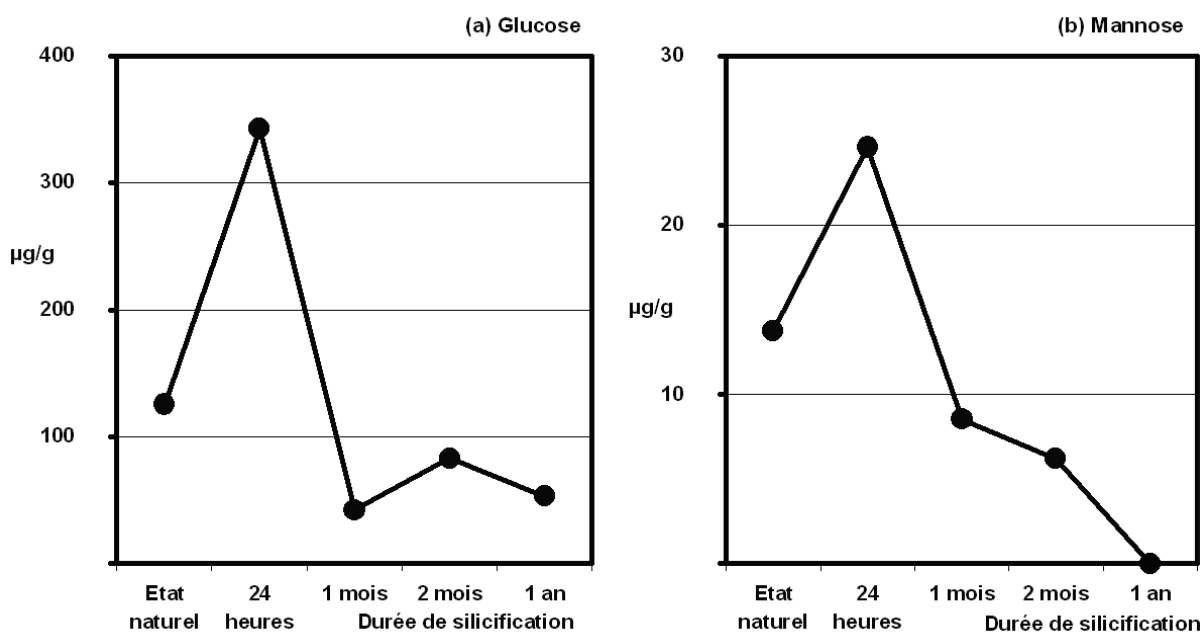
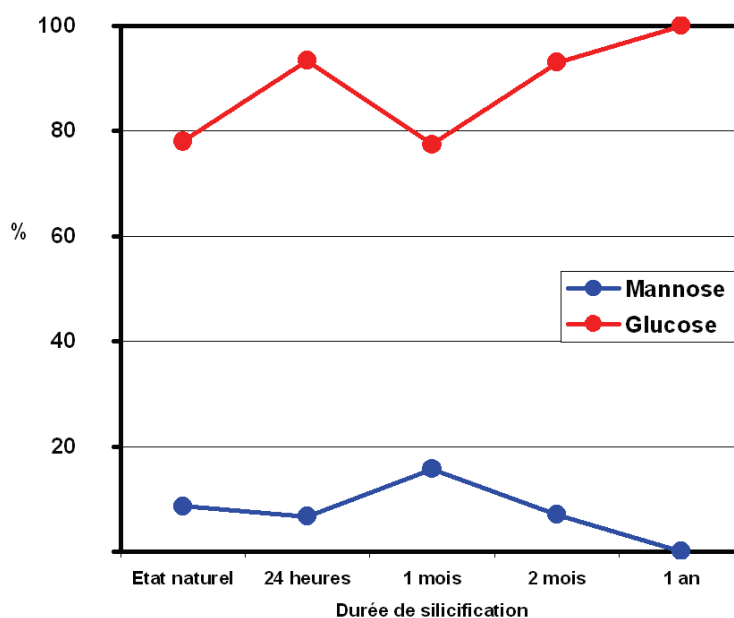


Fig. 3-49 : Evolution des masses (exprimées en µg par g de lyophilisat) du glucose (a), et du mannose (b), au cours de la fossilisation expérimentale.

Dans l'échantillon lyophilisé en fin de la culture, le glucose et le mannose représentaient respectivement 78 % et 9 % de la masse totale de sucres analysés. Ces proportions n'ont pas beaucoup varié par la suite. Si l'on suit l'évolution des quantités de ces sucres au cours de la fossilisation, on note dans les deux cas un maximum après 24 heures de

silicification, ce qui correspond effectivement avec l'augmentation de la masse totale de sucres.

La quantité de mannose a déjà fortement baissé après un mois de fossilisation. Cette baisse se poursuit dans le mois qui suit. Au final, ce composé n'est plus détecté au bout d'un an de fossilisation expérimentale. Le glucose est également beaucoup moins présent après 1 mois de fossilisation ; il n'en reste alors qu'environ 10 % de la quantité présente après 24 heures de fossilisation. Cependant, la baisse ne se poursuit pas, et la quantité de glucose reste par la suite plus ou moins constante. Au final, le glucose est le seul sucre détecté après un an de fossilisation. Par rapport à l'origine, la quantité de glucose finalement présente ne représente que la moitié de sa quantité initiale et un tiers de la quantité totale de monosaccharides (Tableau XXVI).



**Fig. 3-50 : Proportions respective de glucose et de mannose (en % du total de sucres analysés) au cours de la fossilisation.**

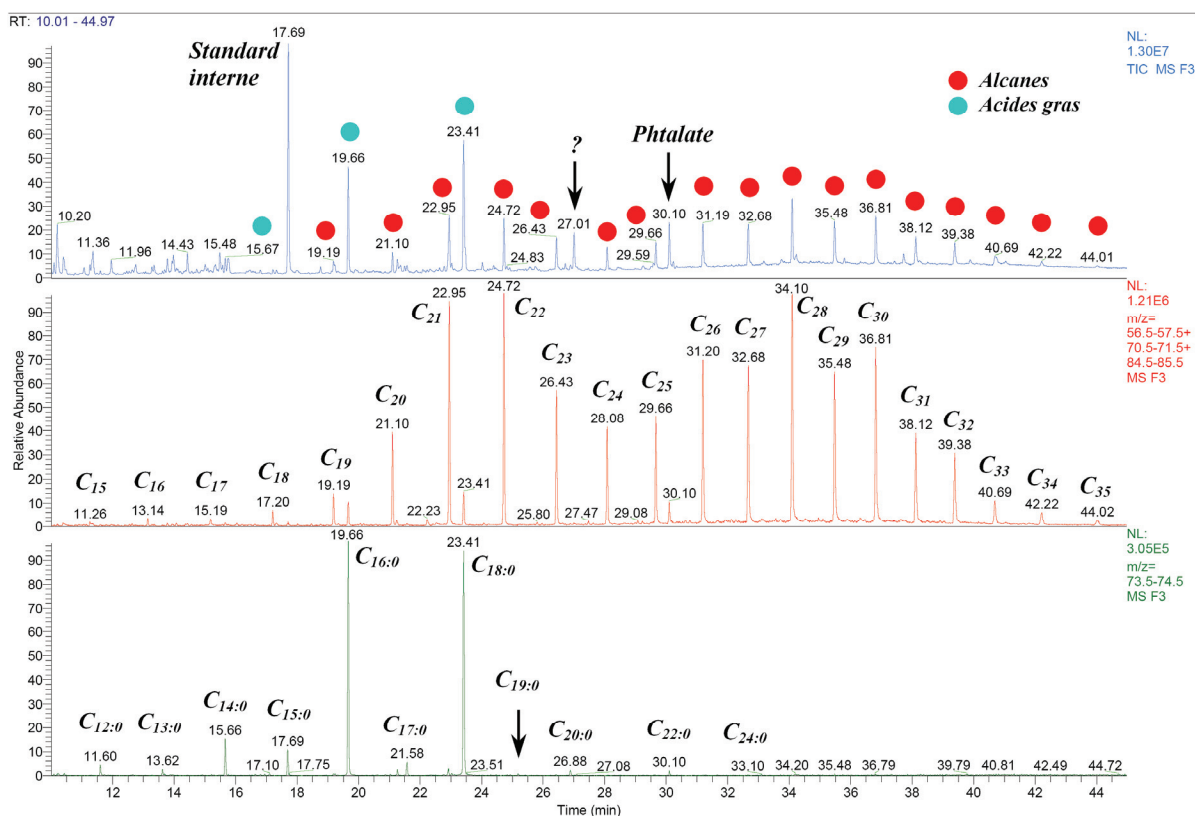
La comparaison de l'évolution respective des pourcentages de mannose et de glucose montre que ces deux sucres ne se comportent pas de la même manière au cours de la fossilisation. La forte hausse de la quantité de sucres, observée après 24 heures de fossilisation, s'accompagne d'une hausse du pourcentage de glucose, tandis que la proportion de mannose reste constante. Ceci s'explique en partie par l'absence d'allose et de galactose après 24 heures de fossilisation. Mais cela suggère aussi que les composés apparus à cette occasion contenaient davantage de glucose. A l'inverse, la baisse des quantités de sucres

observées entre 24 heures et 1 mois de fossilisation s'accompagne d'une baisse du pourcentage du glucose et d'une hausse de celui du mannose, qui suggère que la perte de sucres touche alors davantage le glucose.

Par la suite, ce n'est plus le cas, puisque, comme cela a été précédemment mentionné, les quantités de glucose restent constantes tandis que le mannose disparaît progressivement.

### 3.6.4. Analyses des acides gras durant la fossilisation de *M. jannaschii*

#### 3.6.4.1. Identification des composés et quantification à partir du chromatogramme



**Fig. 3-51 :** Chromatogramme reconstitué (Courant Ionique Total ; en bleu), et chromatogrammes d'ions sélectifs pour mettre en évidence les alcanes (m/z 57+71+85 ; en rouge) et les esters méthyliques d'acides gras (m/z 74 ; en vert). Ces spectres sont le résultat de l'analyse d'une culture de *M. jannaschii* fossilisée pendant 24 heures.

Les résultats de l'analyse des acides gras et des alcanes sont donnés sous la forme d'un chromatogramme brut (Courant Ionique Total ou « TIC »), avec l'ensemble des composés

détectés lors de l'analyse. La première étape du dépouillement est le repérage du pic du standard interne, qui permettra par la suite de quantifier les différents composés.

Pour distinguer les alcanes et les acides gras parmi l'ensemble de pics de l'enregistrement du TIC, on utilise des chromatogrammes d'ions spécifiques qui sélectionnent les composés en fonction de leur rapport  $m/z$ . Ainsi, on met en évidence les alcanes les ions  $m/z = 57, 71$  et  $85$  (ions  $C_nH_{2n+1}$ ). Il en va de même pour les acides gras avec  $m/z = 74$ . Ceci permet de visualiser les pics des séries de composés homologues, puis d'identifier précisément les composés par comparaison avec des chromatogrammes de référence. En rapportant les aires de chacun des pics du TIC avec celui du standard interne (dont on connaît avec précision la quantité ajoutée dans l'échantillon), on peut calculer la masse de chacun des composés analysés.

Le travail de quantification n'est toutefois pas terminé : en effet la détermination des masses à partir du TIC peut poser plusieurs problèmes. Par exemple, il est possible que 2 composés soient élués en même temps et apparaissent donc superposés dans le TIC. Sur la Fig. 3-51, c'est notamment le cas du standard interne et de l'acide gras  $n\text{-C}_{15:0}$ , qui ont tous deux un temps de rétention de 17,69 min. Il peut également y avoir un composé inconnu qui se superpose et ainsi entraîne une surévaluation de la valeur. Dans ces cas, on corrige les masses en les recalculant à partir des chromatogrammes d'ions spécifiques.

### **3.6.4.1. Composition en acides gras d'une culture non fossilisée de *M. jannaschii***

#### ***Composition de l'ensemble de la culture***

Dans le tableau XXVIII ci-après sont présentées les compositions en acides gras d'une culture de *M. jannaschii* (lyophilisée à la fin de la phase exponentielle de croissance) déterminées après thermochimiolysse au TMAH, et extraction par hydrolyse acide, ainsi que celles des EPS et des cellules, séparés en fin de culture et conservés dans l'éthanol absolu (analyse au TMAH seulement)



Tableau 3-XXVIII : Composition en acides gras (exprimée en µg d'acides gras par g de lyophilisat et en % du total) d'une culture lyophilisée de *M. jannaschii*, ainsi que les compositions respectives des cellules et EPS, obtenues après thermochimiolysse au TMAH et extraction par hydrolyse acide.

	<u>Thermochimiolysse au TMAH</u>			<u>Extraction par hydrolyse acide</u>	
	Culture totale		Cellules	Culture totale	
	µg/g	%	%	µg/g	%
<i>n</i> -C <sub>12:0</sub>	0,44	2,35	0,77	0,25	0,28
<i>n</i> -C <sub>13:0</sub>	0,83	4,39	0,15	0,27	0,30
<i>n</i> -C <sub>14:0</sub>	1,07	5,66	10,11	2,86	3,22
<i>n</i> -C <sub>15:0</sub>	1,21	6,41	2,09	4,07	4,58
<i>n</i> -C <sub>16:0</sub>	4,51	23,85	36,99	37,04	41,67
<i>n</i> -C <sub>17:0</sub>	0,44	2,35	2,06	2,94	3,31
<i>n</i> -C <sub>18:0</sub>	6,39	33,79	46,43	22,57	25,39
<i>n</i> -C <sub>19:0</sub>	0,00	0,00	0,00	1,58	1,77
<i>n</i> -C <sub>20:0</sub>	1,53	8,09	1,40	3,32	3,74
<i>n</i> -C <sub>21:0</sub>	0,00	0,00	0,00	0,41	0,47
<i>n</i> -C <sub>22:0</sub>	2,48	13,12	0,00	2,64	2,97
<i>n</i> -C <sub>23:0</sub>	0,00	0,00	0,00	1,01	1,14
<i>n</i> -C <sub>24:0</sub>	0,00	0,00	0,00	6,51	7,32
<i>n</i> -C <sub>25:0</sub>	n.d	n.d	n.d	1,13	1,27
<i>n</i> -C <sub>26:0</sub>	n.d	n.d	n.d	1,88	2,11
<i>n</i> -C <sub>27:0</sub>	n.d	n.d	n.d	0,00	0,00
<i>n</i> -C <sub>28:0</sub>	n.d	n.d	n.d	0,30	0,34
<i>n</i> -C <sub>29:0</sub>	n.d	n.d	n.d	0,00	0,00
<i>n</i> -C <sub>30:0</sub>	n.d	n.d	n.d	0,11	0,12
<b>Total</b>	<b>18,90</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>88,89</b>	<b>100,00</b>

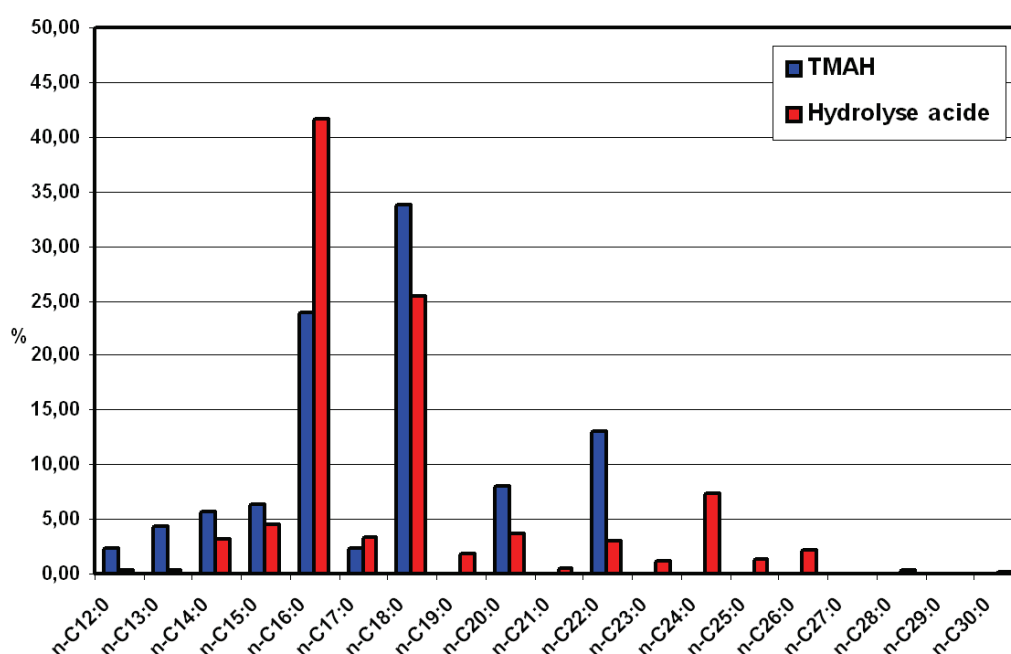


Fig. 3-52 : Compositions en acides gras (exprimée en % du total d'acides gras extraits) d'une culture lyophilisée de *M. jannaschii*, après thermochimiolysse au TMAH et extraction par hydrolyse acide.

L'extraction par thermochimiolysse au TMAH nous montre qu'une assez grande gamme d'acides gras, allant du  $n\text{-C}_{12:0}$  au  $n\text{-C}_{22:0}$ , est présente dans la culture (Fig. 3-52). Dans l'ensemble, on note la prédominance classique des composés avec un nombre pair d'atomes de carbone, avec notamment le  $n\text{-C}_{16:0}$  et le  $n\text{-C}_{18:0}$  qui représentent à eux deux presque 60% du total, puis, dans une moindre mesure, les  $n\text{-C}_{20:0}$  et  $n\text{-C}_{22:0}$ .

L'extraction par hydrolyse acide a permis de détecter une plus grande gamme d'acides gras que la thermochimiolysse, s'étendant parfois jusqu'au  $n\text{-C}_{30:0}$ , mais aussi de détecter des composés non détectés après extraction au TMAH (comme le  $n\text{-C}_{19:0}$  par exemple).

Comme pour l'extraction au TMAH, les composés avec un nombre pair d'atomes de carbone sont prédominants, notamment avec le  $n\text{-C}_{16:0}$  et le  $n\text{-C}_{18:0}$  qui représentent à eux deux 70% du total (Fig. 3-52). Les autres acides gras ne sont donc présents qu'en petite quantité, et ne dépassent pas 5 % du total, à l'exception du  $n\text{-C}_{14:0}$ , dont la proportion approche les 10%.

### Comparaison des compositions en acides gras des EPS et des cellules

Les analyses séparées pour les cellules et EPS extraits d'une culture de *M. jannaschii* n'ont été effectuées que par extraction au TMAH.

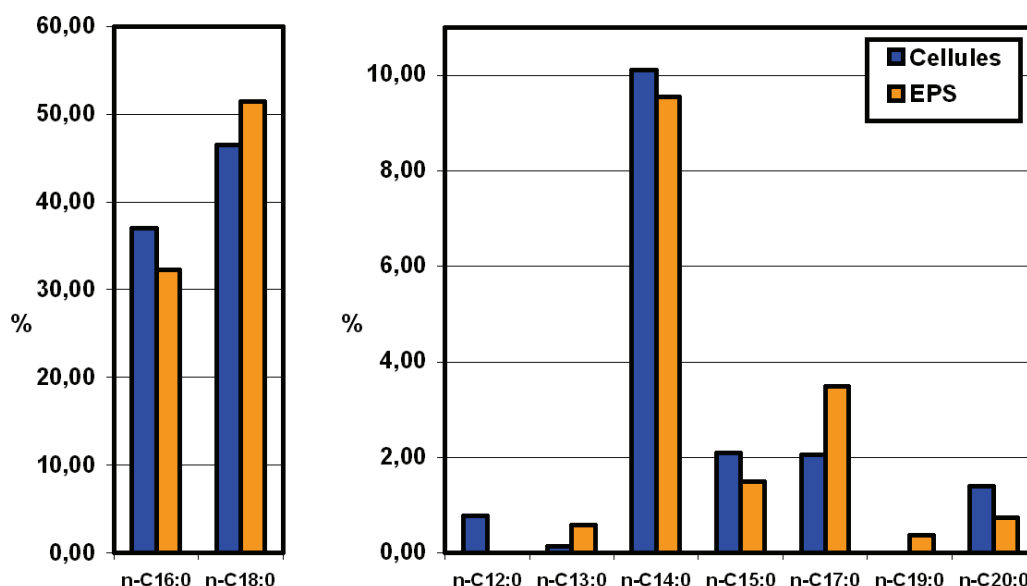


Fig. 3-53 : Compositions spécifiques en acides gras (exprimée en % du total) des cellules et EPS de *M. jannaschii*, obtenues après thermochimiolysse au TMAH.

Dans l'ensemble, seules de légères différences sont à noter entre les compositions en acides gras. Ces différences ne sont rien en comparaison de celles que l'on avait pu observer lors des analyses des acides aminés (cf. paragraphe 3.6.2.1.). Le plus souvent on note seulement un petit excédent de tel ou tel composé dans les EPS ou dans les cellules. Ainsi les cellules sont apparemment plus riches en  $n\text{-C}_{12:0}$ ,  $n\text{-C}_{15:0}$  et  $n\text{-C}_{20:0}$ , tandis que l'on retrouve davantage de  $n\text{-C}_{13:0}$ ,  $n\text{-C}_{17:0}$ ,  $n\text{-C}_{18:0}$  et  $n\text{-C}_{19:0}$  dans les EPS.

### 3.6.4.2. Evolution de la composition en acides gras au cours de la fossilisation

#### Evolution des masses totales d'acides gras analysés au cours de la fossilisation expérimentale

Tableau 3-XXIX : Masses totales d'acides gras analysés (exprimées en  $\mu\text{g}$  par g de lyophilisat) obtenues après thermochimiolyse au TMAH, et extraction par hydrolyse acide.

	Etat naturel	24 heures	1 semaine	1 mois	2 mois	1 an
<i>Thermochimiolyse au TMAH (<math>\mu\text{g/g}</math>)</i>	18,90	182,43	80,39	67,86	99,28	66,55
<i>Extraction par hydrolyse acide (<math>\mu\text{g/g}</math>)</i>	88,89	308,48	23,48	32,91	208,55	108,44

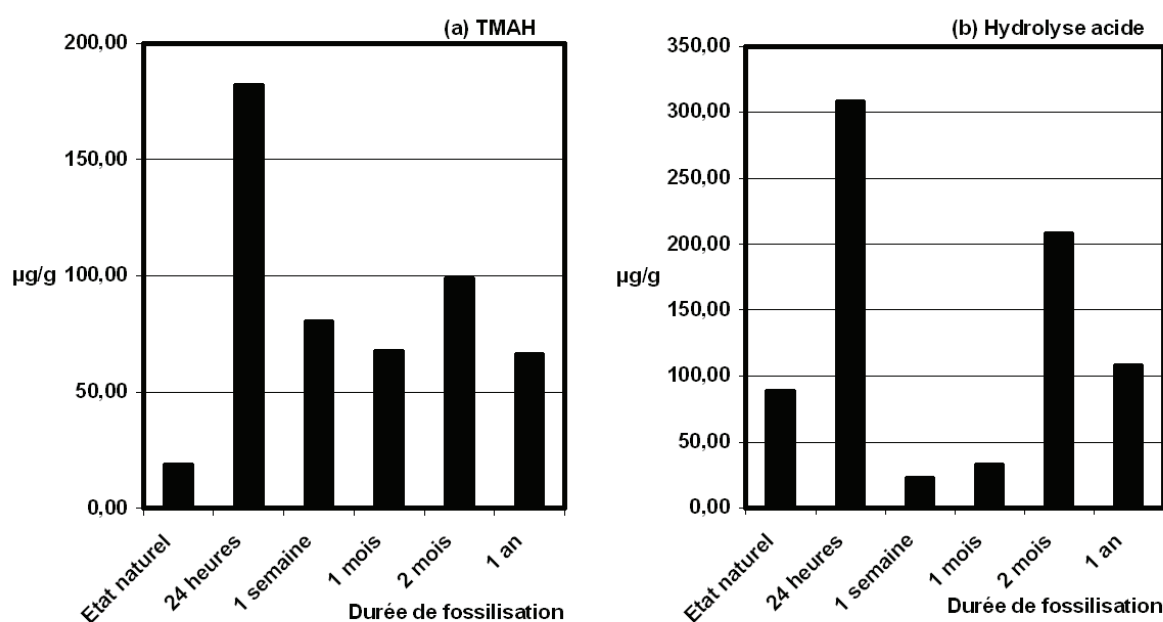


Fig. 3-54 : Masses totales d'acides gras analysés (exprimées en  $\mu\text{g}$  par g de lyophilisat) obtenues (a) après thermochimiolyse au TMAH et (b) extraction par hydrolyse acide.

Dans l'ensemble, les deux types d'extraction (TMAH et hydrolyse acide) ont permis d'analyser des quantités similaires d'échantillons, soit environ une centaine de  $\mu\text{g/g}$ .

Selon les résultats des analyses après thermochimiolysse au TMAH, il apparaît nettement une augmentation de la quantité d'acides gras après 24 heures de fossilisation (Fig. 3-54a). Celle-ci est de plusieurs fois supérieure à la quantité présente dans la culture d'origine (environ 180  $\mu\text{g/g}$  contre environ 20  $\mu\text{g/g}$ ). Par la suite, la masse totale baisse rapidement. Au terme de la première semaine de fossilisation expérimentale, la quantité d'acides gras a ainsi été divisée par deux, par rapport aux quantités présentes après 24 heures. Après une semaine, et jusqu'au terme de la fossilisation expérimentale, cette quantité tend à se stabiliser avec de petites variations qui demeurent sans aucune mesure avec celles observées en début de fossilisation.

En ce qui concerne l'extraction par hydrolyse acide, on observe jusqu'à un mois de fossilisation les mêmes tendances que pour la thermochimiolysse au TMAH, avec une importante hausse de la quantité de matière organique pendant les premières 24 heures de fossilisation, suivie d'une baisse, cette fois très marquée dès la première semaine. A des stades avancés de la fossilisation expérimentale, on note à nouveau la présence de quantités importante d'acides gras (Fig. 3-54b).

### ***Evolution de la composition en acides gras au cours de la fossilisation***

Les tableaux XXX et XXXI présentent les compositions en acides gras à différentes étapes de la fossilisation expérimentale, extraits respectivement par thermochimiolysse au TMAH, et par hydrolyse acide.

Aucun problème n'a été rencontré lors des analyses des échantillons après thermochimiolysse au TMAH. La jonction des deux séries d'analyses s'est faite de manière satisfaisante.

Ce ne fut pas le cas pour les analyses effectuées après extraction par hydrolyse acide. Tout d'abord, la seconde série d'analyses n'a pas permis de mesurer les composés allant du  $n\text{-C}_{26:0}$  au  $n\text{-C}_{30:0}$  (Tableau XXXI). Pour les autres composés, si des différences apparaissent, les ordres de grandeurs des pourcentages sont globalement similaires. Malgré ces similitudes, il a souvent été difficile de faire correctement la jonction entre les deux séries d'analyses du fait des incertitudes que cela pouvait entraîner. S'il a été possible de raisonner sur les masses

## Résultats

totales analysées, ainsi sur que les acides gras majoritaires ( $n\text{-C}_{16:0}$  et  $n\text{-C}_{18:0}$ ), cela n'a pas été possible pour les composés présents en plus petites quantités.

**Tableau 3-XXX : Compositions en acides gras (exprimées en  $\mu\text{g}$  par g de lyophilisat, et en % du total) au cours de la fossilisation expérimentale, obtenues après thermochimiolysse au TMAH.**

	Etat naturel		24 heures		1 semaine		1 mois		2 mois		1 an	
	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
$n\text{-C}_{12:0}$	0,44	2,35	2,56	1,40	3,91	4,86	3,27	4,81	11,26	11,34	3,59	5,40
$n\text{-C}_{13:0}$	0,83	4,39	1,50	0,82	3,52	4,38	4,51	6,65	12,67	12,76	0,00	0,00
$n\text{-C}_{14:0}$	1,07	5,66	9,56	5,24	12,52	15,57	9,35	13,77	13,55	13,65	9,64	14,49
$n\text{-C}_{15:0}$	1,21	6,41	6,91	3,79	5,48	6,82	4,30	6,34	5,67	5,71	1,35	2,03
$n\text{-C}_{16:0}$	4,51	23,85	67,67	37,10	41,25	51,32	29,05	42,81	29,73	29,95	31,07	46,68
$n\text{-C}_{17:0}$	0,44	2,35	6,63	3,64	0,98	1,21	0,00	0,00	1,40	1,41	0,88	1,32
$n\text{-C}_{18:0}$	6,39	33,79	82,80	45,38	12,73	15,84	15,47	22,80	22,75	22,92	20,02	30,08
$n\text{-C}_{19:0}$	0,00	0,00	0,56	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$n\text{-C}_{20:0}$	1,53	8,09	1,82	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	0,85	0,00	0,00
$n\text{-C}_{21:0}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$n\text{-C}_{22:0}$	2,48	13,12	2,42	1,32	0,00	0,00	1,92	2,83	1,40	1,41	0,00	0,00
$n\text{-C}_{23:0}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$n\text{-C}_{24:0}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>	<b>18,90</b>	<b>100,00</b>	<b>182,43</b>	<b>100,00</b>	<b>80,39</b>	<b>100,00</b>	<b>67,86</b>	<b>100,00</b>	<b>99,28</b>	<b>100,00</b>	<b>66,55</b>	<b>100,00</b>

**Tableau 3-XXXI Compositions en acides gras (exprimées en  $\mu\text{g}$  par g de lyophilisat, et en % du total) au cours de la fossilisation expérimentale, obtenues après extraction par hydrolyse acide.**

	Etat naturel		24 heures		1 semaine		1 mois		2 mois		1 an	
	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
$n\text{-C}_{12:0}$	0,25	0,28	n.d.	n.d.	0,00	0,00	1,07	3,26	1,16	0,56	0,88	0,81
$n\text{-C}_{13:0}$	0,27	0,30	n.d.	n.d.	0,00	0,00	0,28	0,85	1,30	0,62	0,63	0,58
$n\text{-C}_{14:0}$	2,86	3,22	n.d.	n.d.	0,31	1,33	2,13	6,46	7,94	3,81	9,86	9,09
$n\text{-C}_{15:0}$	4,07	4,58	n.d.	n.d.	0,64	2,73	1,44	4,38	6,68	3,20	3,40	3,14
$n\text{-C}_{16:0}$	37,04	41,67	57,86	18,76	8,16	34,77	11,26	34,22	86,04	41,26	40,55	37,39
$n\text{-C}_{17:0}$	2,94	3,31	7,92	2,57	0,86	3,68	0,87	2,64	4,82	2,31	3,83	3,53
$n\text{-C}_{18:0}$	22,57	25,39	180,93	58,65	9,32	39,69	10,74	32,65	78,96	37,86	40,13	37,01
$n\text{-C}_{19:0}$	1,58	1,77	43,16	13,99	1,71	7,26	0,28	0,86	5,46	2,62	0,00	0,00
$n\text{-C}_{20:0}$	3,32	3,74	18,61	6,03	1,31	5,59	1,44	4,36	3,73	1,79	1,71	1,58
$n\text{-C}_{21:0}$	0,41	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,10	0,53	0,00	0,00
$n\text{-C}_{22:0}$	2,64	2,97	0,00	0,00	1,16	4,94	0,67	2,04	2,39	1,15	0,77	0,71
$n\text{-C}_{23:0}$	1,01	1,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,83	1,43	0,68	0,58	0,53
$n\text{-C}_{24:0}$	6,51	7,32	0,00	0,00	0,00	0,00	1,08	3,29	3,59	1,72	2,44	2,25
$n\text{-C}_{25:0}$	1,13	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,48	1,89	0,90	1,85	1,71
$n\text{-C}_{26:0}$	1,88	2,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	1,71	2,06	0,99	1,29	1,19
$n\text{-C}_{27:0}$	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,00	0,00	n.d.	n.d.	0,00	0,00
$n\text{-C}_{28:0}$	0,30	0,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,54	1,65	n.d.	n.d.	0,53	0,49
$n\text{-C}_{29:0}$	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,00	0,00	n.d.	n.d.	0,00	0,00
$n\text{-C}_{30:0}$	0,11	0,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,10	0,31	n.d.	n.d.	0,00	0,00
<b>Total</b>	<b>88,89</b>	<b>100,00</b>	<b>308,48</b>	<b>100,00</b>	<b>23,48</b>	<b>100,00</b>	<b>32,91</b>	<b>100,00</b>	<b>208,55</b>	<b>100,00</b>	<b>108,44</b>	<b>100,00</b>

De plus l'analyse de l'échantillon « 24 heures de fossilisation » semble avoir été affectée de divers problèmes : aucun composé n'a été détecté avant le  $n\text{-C}_{16:0}$  (Tableau XXXI), et ce dernier est apparu anormalement faible. Cela a donc empêché, dans le cas de l'hydrolyse acide, de constater réellement ce qui a pu se produire pendant la première semaine de fossilisation. Les chromatogrammes des autres échantillons n'ont pas montré cette anomalie.

Pour ces raisons, les résultats obtenus des analyses faites après extraction par hydrolyse acide ont été limités.

### Conséquence de l'ajout de la silice

Les masses totales d'acides gras analysés ont fortement augmenté pendant les 24 premières heures de fossilisation, que ce soit dans le cas du TMAH ou de l'hydrolyse acide. L'étude de la composition en acides gras de l'échantillon « 24 heures de fossilisation » permet de juger des conséquences chimiques de l'ajout de la silice dans les milieux.

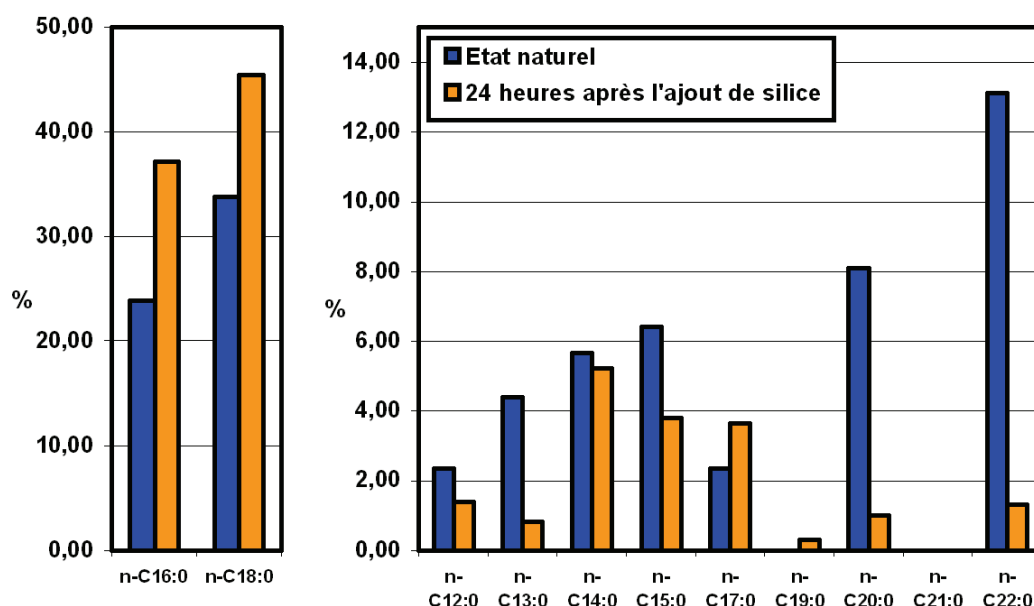


Fig. 3-55 : Compositions en acides gras (exprimées en % du total) des cultures de *M. jannaschii* à l'état naturel, et 24 heures après l'injection de la silice, obtenues après thermochimioolyse au TMAH.



Seules les analyses après thermochimiolysse au TMAH ont vraiment pu fournir des informations, en raison des problèmes évoqués plus haut en ce qui concerne l'échantillon « 24 heures de fossilisation » traité par hydrolyse acide.

Ainsi, l'extraction au TMAH a permis de trouver 10 fois plus d'acides gras après 24 heures de fossilisation qu'à l'état naturel. De plus ces résultats indiquent aussi que le matériel analysé au bout de ces 24 première heures était plutôt riche en  $n\text{-C}_{16:0}$  et en  $n\text{-C}_{18:0}$ , plutôt dépourvu de  $n\text{-C}_{12:0}$ ,  $n\text{-C}_{13:0}$  et de  $n\text{-C}_{15:0}$ , et franchement appauvri en  $n\text{-C}_{20:0}$  et en  $n\text{-C}_{22:0}$  (Fig. 3-55).

### *Suivi des différents acides gras au cours de la fossilisation expérimentale*

En raison des difficultés rencontrées lors de l'analyse des échantillons traités par hydrolyse acide, ce suivi se limite uniquement aux analyses effectuées après thermochimiolysse au TMAH. De plus, la plupart des acides gras n'ont été analysés qu'en petites quantités, à l'exception du  $n\text{-C}_{16:0}$  et du  $n\text{-C}_{18:0}$ , ce qui rend l'étude de leur comportement au cours de la fossilisation difficile, car exposée à des artefacts ou des incertitudes. Au final, seuls les deux principaux composés ( $n\text{-C}_{16:0}$  et  $n\text{-C}_{18:0}$ ) ont pu être suivis correctement au cours de la fossilisation expérimentale (Fig. 3-56)

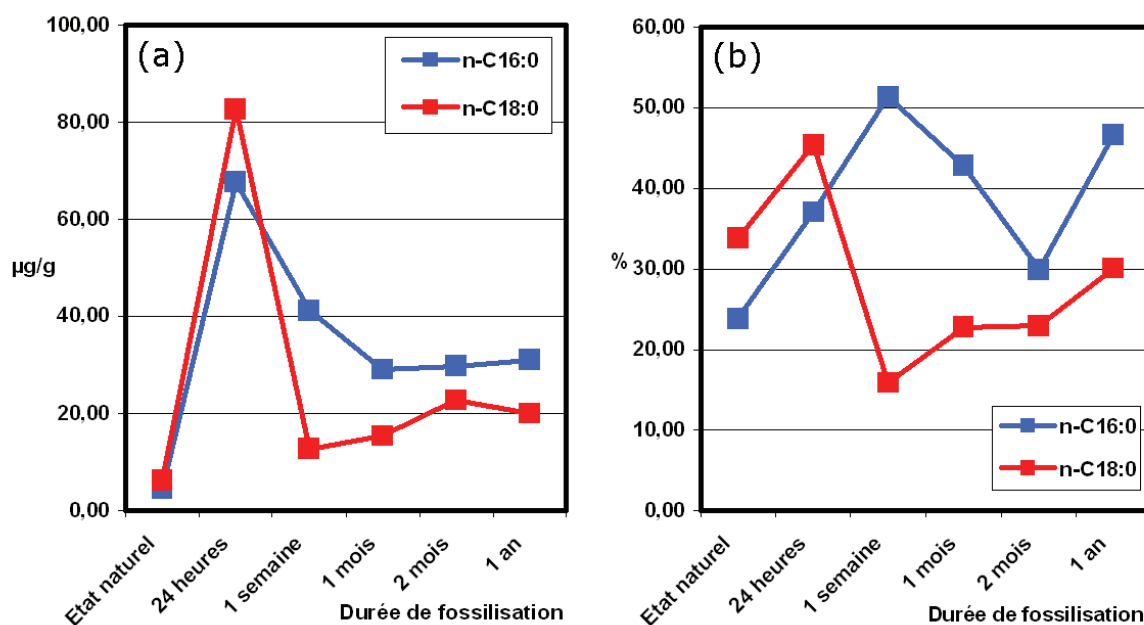


Fig. 3-56 : Evolutions (a) des masses (exprimées en  $\mu\text{g}$  par g de lyophilisat) et (b) des pourcentages (exprimés en % du total) des acides gras  $n\text{-C}_{16:0}$  et  $n\text{-C}_{18:0}$  au cours de la fossilisation expérimentale, après thermochimiolysse au TMAH.

A première vue, l'évolution des masses des deux acides gras  $n\text{-C}_{16:0}$  et  $n\text{-C}_{18:0}$  suit le profil des masses totales analysées (Fig. 3-56a), avec une forte hausse pendant les premières 24 heures, immédiatement suivie d'une baisse importante, avant de se stabiliser lors des stades plus avancés de la fossilisation expérimentale. Des petites différences sont toutefois à noter. Ainsi, entre 24 heures et 1 semaine de fossilisation, le  $n\text{-C}_{18:0}$  disparaît presque aussi rapidement qu'il est apparu, avant de se stabiliser aussitôt par la suite. La disparition du  $n\text{-C}_{16:0}$  est plus lente, et se poursuit tout le long du premier mois de fossilisation. Cela se traduit au niveau des pourcentages par des évolutions inverses de ces deux composés entre 24 heures et 1 mois de fossilisation.

### ***Comparaison entre le précipité de silice et le surnageant au terme de la fossilisation expérimentale***

L'analyse des deux échantillons, correspondant, d'une part, au précipité de silice formé au fond du flacon de culture après 1 an de fossilisation expérimentale et d'autre part, au surnageant, n'a été faite qu'après thermochimiolysé au TMAH.

**Tableau 3-XXXII : Masses totales d'acides gras analysés, après un an de fossilisation expérimentale, du précipité de silice et du surnageant d'une culture de *M. jannaschii*.**

	Précipité	Surnageant
µg/g	66,55	8,83

La quantité d'acides gras présente dans le surnageant est très faible par rapport aux quantités restantes dans le précipité après 1 an de fossilisation expérimentale (Tableau 3-XXXII). Le surnageant ne présente que quelques acides gras, plutôt légers ( $n\text{-C}_{16:0}$  et inférieurs), mais souvent dans les mêmes proportions que le précipité de silice (Fig. 3-57).

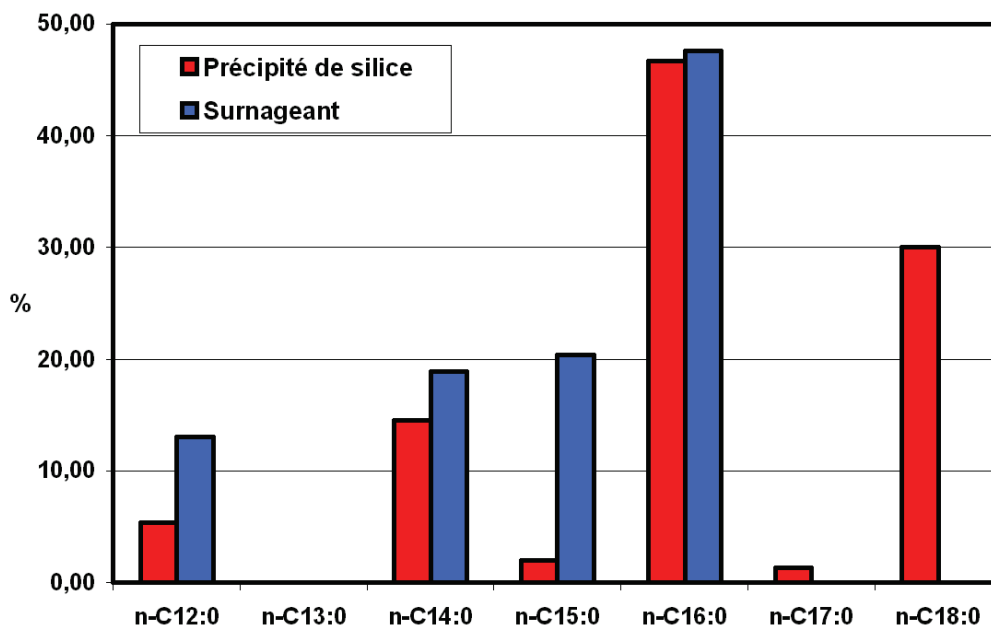


Fig. 3-57 : Compositions en acides gras (exprimée en % du total d'acides gras extraits) du précipité de silice formé dans les culture de *M. jannaschii* après un an de fossilisation expérimentale, ainsi que du surnageant.

### Comparaison des compositions en acides gras au début et au terme de la fossilisation expérimentale

Comme cela avait été fait pour les acides aminés, la comparaison des compositions initiales et finales des acides gras permet de tirer un premier bilan de la fossilisation.

Dans le cas des extractions par hydrolyse acide, les échantillons « *Etat naturel* » et « *1 an de fossilisation* » ont été analysés lors de la même série, et ont donnés des résultats corrects. Il est donc possible ici de prendre ces données en compte.

Les compositions initiales et finales en acides gras, déterminées après traitement au TMAH, sont nettement différentes. A cela s'ajoute que la quantité totale analysée au final est plus de trois fois supérieure à ce qui était présent à l'origine. On note essentiellement, au terme de la fossilisation expérimentale, un enrichissement en acides gras légers ( $n\text{-C}_{12:0}$ ,  $n\text{-C}_{14:0}$ ,  $n\text{-C}_{16:0}$ ), et l'absence des composés plus lourds qui étaient présents dans la culture originelle ( $n\text{-C}_{20:0}$ ,  $n\text{-C}_{22:0}$ ).

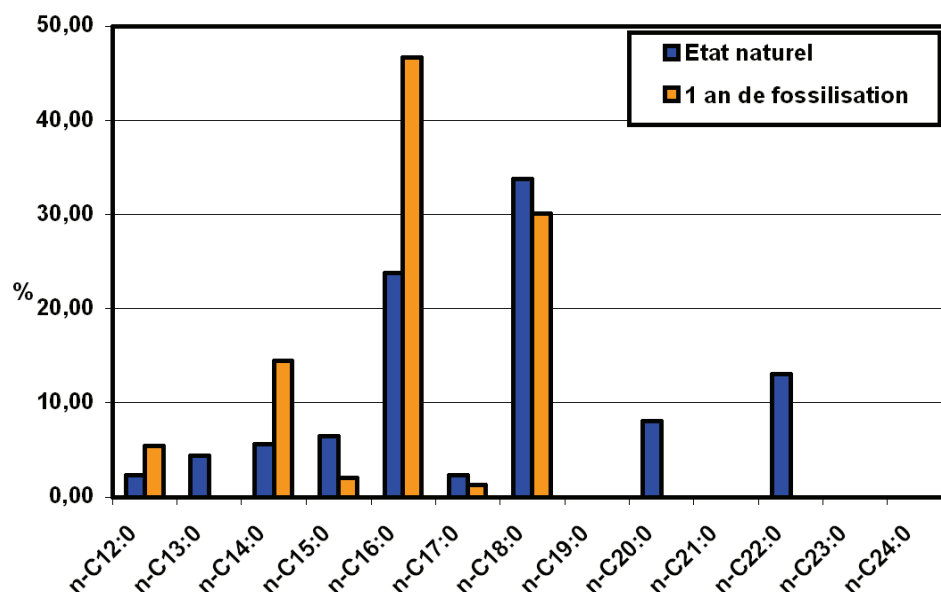


Fig. 3-58 : Compositions en acides gras (exprimée en % du total d'acides gras extraits) du précipité de silice formé dans les cultures de *M. jannaschii* à l'état naturel et après 1 an de fossilisation expérimentale, obtenues après thermochimiolysse au TMAH.

En ce qui concerne les acides gras extraits par hydrolyse acide, la quantité restant au final dans le précipité de silice est équivalente à celle qui était présente dans la culture à l'état naturel (Tableau 3-XXIX). A l'inverse des analyses faites après thermochimiolysse au TMAH, les compositions au début et au terme de la fossilisation expérimentale sont identiques, à peu de choses près (Fig. 3-59).

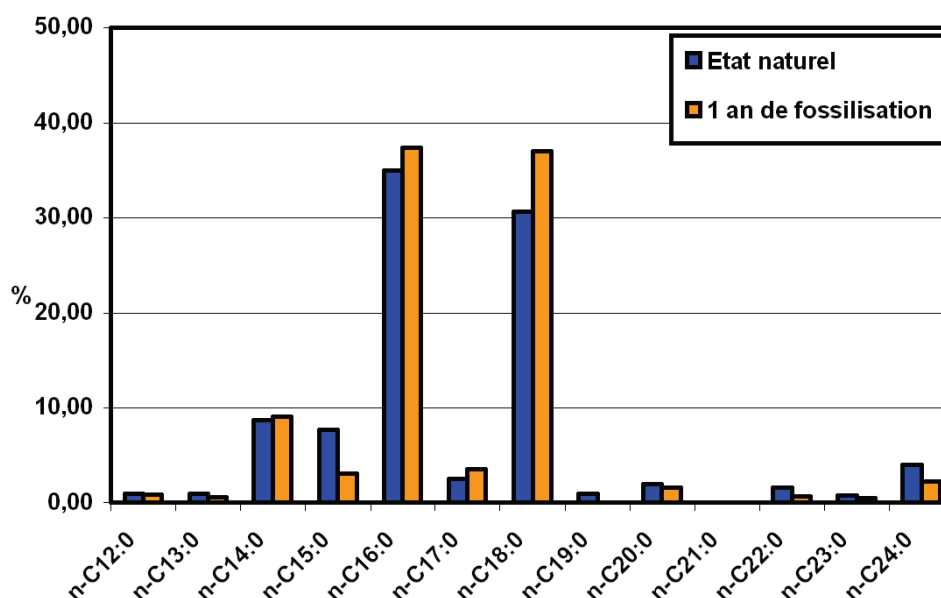


Fig. 3-59 : Compositions en acides gras (exprimée en % du total d'acides gras extraits) du précipité de silice formé dans les cultures de *M. jannaschii* à l'état naturel et après 1 an de fossilisation expérimentale, obtenues après extraction par hydrolyse acide.

### **3.6.5. Analyses des alcanes**

Comme cela a été mentionné au paragraphe 3.6.4.1., les chromatogrammes d'où ont été tirés les informations concernant les acides gras ont également fournis des informations concernant les alcanes. L'identification des composés et leur quantification a permis de montrer qu'une large gamme, allant du  $n\text{-C}_{15}$  au  $n\text{-C}_{35}$ , était présente dans les échantillons (Fig. 3-51).

Toutefois, cette famille de composés est extrêmement sensible à une contamination extérieure, et le plus souvent les données obtenues sont suspectes, voire inexploitable.

Si les compositions en alcanes des différents échantillons obtenus lors de la fossilisation expérimentale semblaient régulières, avec des chromatogrammes montrant des séries de pics très nettes, l'analyse des données n'a pas été pour l'instant poursuivie en raison des doutes concernant l'origine de ces alcanes.

### **3.6.6. Analyses des lipides membranaires**

L'analyse des lipides membranaires après extraction par l'acide iodhydrique (HI) a été effectuée, et a donné à première vue des chromatogrammes intéressants. La quantification des différents composés et l'interprétation de ces données est actuellement en cours.

## **Quatrième partie : Discussion**

### **4.1. Fossilisation expérimentale de micro-organismes**

#### **4.1.1. Fossilisation expérimentale d'Archées**

##### **4.1.1.1. Silicification de *P. abyssi***

La silicification de *P. abyssi* semble avoir commencé très tôt, avec la précipitation de nanoparticules de silice à la surface des cellules, et avec le piégeage des cellules dans une matrice de silice dense et poreuse après seulement 24 heures (Figs. 3-1b et 3-1c). Les cellules montrent cependant une bonne préservation de leur morphologie (formes turgides), comparées aux cellules qui ont été exposées à la silice pendant de plus longues périodes (par exemple, après 9 mois, Fig. 3-4a). Ces dernières sont aplaties, avec une paroi plissée. Bien que des cristallites de silice aient été observés à la surface des cellules, c'est seulement au terme de la fossilisation expérimentale que ces nanoparticules ont été vues à l'intérieur des cellules sur les micrographies MET (Figs. 3-5g et h), et que des cellules vidées de leur matériel cytoplasmique ont été observées au côté de cellules non lysées (Figs. 3-5f et g).

Il faut toutefois tenir compte du fait que des cellules étaient probablement encore vivantes plusieurs mois après le début de la fossilisation. Westall *et al.* (1995) avaient déjà remarqué un phénomène similaire avec les spirochètes, à la surface desquels des granules de silice s'étaient déposés, continuant de vivre jusqu'à 4 mois dans une solution saturée en silice. Dans le même esprit, Lalonde *et al.* (2005) ont montré que l'Aquificale *Sulfurihydrogenibium azorense* demeurait viable et pouvait croître en présence de fortes concentrations de silice.

Toutefois, après un an de fossilisation, les micrographies MEB et MET montraient une évolution vers un stade plus avancé de la fossilisation. La matrice de silice enserre maintenant profondément les cellules. Certaines cellules ont désormais perdu leur matériel cytoplasmique, mais leur trace dans la matrice de silice reste nette. Des particules de silice sont désormais visible à l'intérieur des cellules (qu'elles soient vides ou non ; Figs. 3-5f et g).

Ceci semble être le début d'une nouvelle étape dans le remplacement progressif des structures cellulaires par la silice, comme cela a été décrit dans certains cas de fossilisation naturelle (Schultze-Lam *et al.*, 1995) ou expérimentale (Westall *et al.*, 1995 ; Westall, 1997 ;



Toporski *et al.*, 2002). Selon ce schéma, les particules de silice devraient ensuite remplir progressivement l'intérieur de la cellule, et fusionner à terme, pour ne laisser dans la matrice minérale que l'empreinte de la paroi. Un aperçu de cette séquence est également illustré par les micrographies MEB faite sur le *sinter* prélevé à Octopus Spring (Yellowstone) (cf. paragraphe 4.3.4.2., Figs. 3-39c, d et e).

Sur les micrographies MEB, le précipité de silice semble hétérogène, et n'est visible que sur une partie de la paroi de la cellule, laissant celle-ci visible par endroits (Fig. 3-4b, après 9 mois de fossilisation ; Fig. 3-5b, après 1 an). Toutefois, les micrographies MET montrent que cette précipitation est homogène sur l'intégralité du pourtour de la cellule (Fig. 3-2b). Mais cette minéralisation est très fine (à peine une dizaine de nm après un mois de fossilisation). Il faut donc considérer que les zones apparemment vierges de précipitation de silice au MEB sont sans doute recouvertes de fines particules de silice, que la résolution du MEB (inférieure à celle du MET) ne permet pas d'observer. Il est également possible que le séchage par la méthode du point critique ait éliminé une partie de la silice ayant précipité sur les cellules.

*P. abyssi* ne peut pas se développer à 60°C (la température de la fossilisation ; Erauso *et al.*, 1993), et les nutriments ont été épuisés quelques jours après le début de la fossilisation. Ceux-ci sont épuisés environ 96 heures après le lancement de la culture (Le Romancer, communication personnelle), donc environ trois jours après le début de la fossilisation expérimentale. Or, les essais de remise en culture ont montré que des cellules de *P. abyssi* étaient encore vivantes après 1 mois de silicification. On peut alors supposer que, à court de nutriments et à une température insuffisante pour leur division, les cellules se sont mises en dormance sans se dégrader (c'est ce qui se produit quand les cellules de *P. abyssi* sont conservées à 4°C pour une utilisation ultérieure).

Cet état dormant a pu rendre au passage les cellules plus résistantes au changement des conditions du milieu entraînées par l'injection de silice, ainsi qu'au processus de fossilisation. Elles se sont « endurcies » d'une certaine manière. Marteinsson *et al.* (1997) ont montré la faculté de *P. abyssi* à survivre à différentes conditions de stress (dont le manque de nutriments, la présence d'oxygène, la température). Ils ont de plus noté que les cellules étaient davantage résistantes quand elles étaient déjà en manque de nutriments.

Le fait que des cellules de *P. abyssi* soient restées vivantes plusieurs mois dans un milieu saturé en silice suggère qu'elles pourraient être dans une certaine mesure tolérantes à la silice. Cependant, il n'est pas possible de conclure avec certitude que *P. abyssi* pourrait croître de manière permanente dans un environnement saturé en silice avec les seuls résultats de cette fossilisation expérimentale. Une série de tentatives de cultures dans un milieu saturé en silice pourrait donner une réponse à cette question.

### **4.1.1.2. Silicification de *M. jannaschii***

Les résultats de la fossilisation expérimentale de *M. jannaschii* indiquent que les cellules sont mortes et ont lysé rapidement après le début de la silicification expérimentale, puisque, notamment, aucune cellule n'était visible après un mois. Les quelques cellules encore présentes après 24 heures ou 1 semaine étaient assez déformées ou lysées, sans dépôt apparent de nanoparticules de silice à leur surface (Figs. 3-8a et 3-9a). De plus, dans certains cas, les observations MET ont montré un net espace entre le précipité de silice et l'enveloppe externe des cellules (Fig. 3-8d). L'explication est peut-être que la silice a précipité préférentiellement sur les EPS que sur les cellules elles-mêmes.

Les observations de Lalonde *et al.* (2005) sont assez comparables à celles-ci, avec le fait que la silicification de *S. asorenze* n'ait montré aucune précipitation directe de silice sur les parois cellulaires, bien que la silice ait précipité sur les EPS après 50 heures de silicification. Dans notre fossilisation expérimentale, la présence d'un vide entre le précipité de silice et la paroi cellulaire (Fig. 3-8d) pourrait être dû aux cellules de *M. jannaschii* qui se protègent activement de la silice. Cela signifierait que cette cellule était encore vivante. A l'opposé, les cellules lysées et mortes (Fig. 3-8e) n'étaient pas entourées d'un tel vide, ce qui va dans le sens de l'hypothèse d'un mécanisme actif de protection. Une synthèse de la protection active des cellules sera faite plus loin (cf. paragraphe 4.1.3.3.), puisque des phénomènes similaires ou équivalents ont été constatés lors de la fossilisation des autres micro-organismes.

#### **4.1.2.3. Modification du pH et choc osmotique suite à l'injection de la silice**

Les nettes différences entre les fossilisations expérimentales de *P. abyssi* et *M. jannaschii* montrent que les caractéristiques propres de chaque souche ont joué un rôle déterminant pour leur préservation (ou absence de préservation).

Dans cette fossilisation expérimentale, des changements environnementaux ont été provoqués par l'injection rapide de la solution de silicate de sodium dans le milieu. Elle a entraîné une augmentation du pH, mais également une modification de l'équilibre osmotique. La solution injectée était très concentrée et fortement basique, contenant environ 10 % de NaOH. De sorte qu'une faible quantité a suffi pour obtenir une concentration finale en silice de 500 ppm, mais était suffisante pour faire passer le pH de 6,5 (pour *M. jannaschii*) et 7,0 (pour *P. abyssi*) à 7,8 et 7,5 respectivement. *M. jannaschii* n'est pas capable de croître à des pH supérieurs à 7,0 (Jones *et al.*, 1983), tandis que *P. abyssi* est toujours capable de se développer à pH 8,0 (Erauso *et al.*, 1993). Cela peut en partie expliquer pourquoi des cellules vivantes de *P. abyssi* étaient encore présentes dans le milieu un mois après l'injection de l'agent silicifiant.

L'injection de la solution de silice a également modifié la composition du milieu de culture et, par conséquent, l'équilibre osmotique, avec une augmentation des concentrations en silice et en hydroxyde de sodium. Comme les milieux de culture utilisés pour ces deux micro-organismes marins contenaient déjà une forte concentration en ion  $\text{Na}^+$  avant l'injection ( $> 20 \text{ g/L}$ ), la faible quantité injectée n'a sans doute pas modifié de manière significative la concentration ou l'équilibre osmotique des ions  $\text{Na}^+$ .

En revanche, les cellules ont dû faire face à une solution soudainement saturée en silice. Comme suggéré par Birnbaum *et al.* (1989), les cellules peuvent supporter les changements de concentration en silice, soit en absorbant de la silice, soit en évacuant de l'eau. Etant donné que les cellules doivent maintenir une pression osmotique interne supérieure à l'environnement extérieur afin de préserver leur forme, l'augmentation soudaine de la concentration en silice a certainement représenté un choc osmotique important. Il était alors nécessaire pour les cellules d'absorber de grandes quantités de silice afin de compenser le déséquilibre. Plusieurs heures après l'injection de la silice, la cellule atteint à nouveau l'équilibre osmotique. Cependant, quand la silice colloïdale précipite dans une solution

aqueuse saturée (Birnbaum *et al.*, 1989 ; Sievert & Scott, 1963), il y a une baisse de la concentration en silice à l'extérieur des cellules, comparée à l'intérieur. Pour faire face à cette baisse, les cellules doivent relarguer de la silice dans le milieu et absorber de l'eau. Ces échanges peuvent conduire à des changements de la forme de la cellule et, dans les cas extrêmes, à une lyse. Il semble que ce système de régulation osmotique ait fonctionné dans le cas de *P. abyssi*, qui a survécu plusieurs mois dans un milieu saturé en silice, mais pas pour *M. jannaschii* qui a lysé très rapidement après l'injection de la silice. Jones *et al.* (1983) ont, en effet, décrit *M. jannaschii* comme étant une souche très fragile d'un point de vue osmotique. La lyse des cellules est donc très certainement due aux changements rapides du pH et/ou de l'équilibre osmotique.

#### **4.1.2.3. Bilan de la fossilisation des Archées**

A notre connaissance, il s'agissait de la première fossilisation expérimentale d'Archées. En faisant pour l'instant abstraction des résultats des autres fossilisations expérimentales, la fossilisation de *M. jannaschii* et de *P. abyssi* apporte déjà plusieurs informations d'importance.

La précipitation de silice sur les parois de *P. abyssi* et la préservation des cellules après un an montre que la fossilisation d'Archées est possible, dans des conditions expérimentales proches des conditions naturelles.

Cette préservation des cellules permet également de valider le mode opératoire qui a été utilisé pour cette étude, et de lever les doutes que nous avons formulés à son encontre après la constatation de la non-fossilisation des cellules de *M. jannaschii*.

Ainsi, l'absence de fossilisation de *M. jannaschii* montre qu'il y peut y avoir des souches de micro-organismes qui ne se fossilisent pas. Ceci apporte une nuance à la conclusion générale de l'ensemble des fossilisations expérimentales, énoncée par Konhauser *et al.* (2004), qui était que la silicification est la conséquence inévitable de l'exposition de micro-organismes à une solution saturée en silice.

La différence de comportements entre *M. jannaschii* et *P. abyssi* lors de la fossilisation expérimentale est d'autant plus frappante que ces deux souches sont très proches d'un point de vue phylogénétique, possèdent la même organisation cellulaire, et vivent dans des environnements comparables (autour des fumeurs noirs).

D'autres phénomènes ont été mis en évidence ou soupçonnés lors de la fossilisation de *M. jannaschii*, comme la présence d'un mécanisme actif de protection contre la précipitation de silice, ou une production d'EPS en réaction à l'injection de la silice dans le milieu. Ils seront commentés plus loin puisqu'ils ont également parfois été constatés lors de la fossilisation expérimentale des autres souches utilisées dans cette étude.

#### **4.1.2. Fossilisation expérimentale de Bactéries**

##### **4.1.2.1. Silicification de *Rhodovulum* sp.**

La fossilisation de la Bactérie non thermophile *Rhodovulum* sp. a permis de voir l'influence de la température sur le processus de la silicification, tant au niveau des cellules qu'en ce qui concerne la précipitation de la silice.

##### ***Fossilisation à température ambiante***

Les résultats de la fossilisation expérimentale de *Rhodovulum* sp. à température ambiante se rapprochent assez de la fossilisation de *P. abyssi*. Il y a eu une préservation des cellules sur la durée, sans toutefois qu'il y ait eu de précipitation importante de silice sur la paroi des cellules.

Les cellules étaient ainsi en très bon état après 1 mois de fossilisation, mais montraient des signes de déformations après 9 mois (Figs. 3-13c et d). On peut imaginer un scénario similaire à celui de *P. abyssi* : les cellules qui n'ont pas été marquées par le changement de pH (de 7,0 à 8,5) sont restées vivantes un certain temps (comme suggéré par les observations en microscopie optique), et sont entrées en dormance lorsqu'elles se sont retrouvées à cours de nutriments.

Toutefois, même après 9 mois de fossilisation, la précipitation de la silice sur les parois n'est pas aussi importante que pour *P. abyssi* (Fig. 4-1).

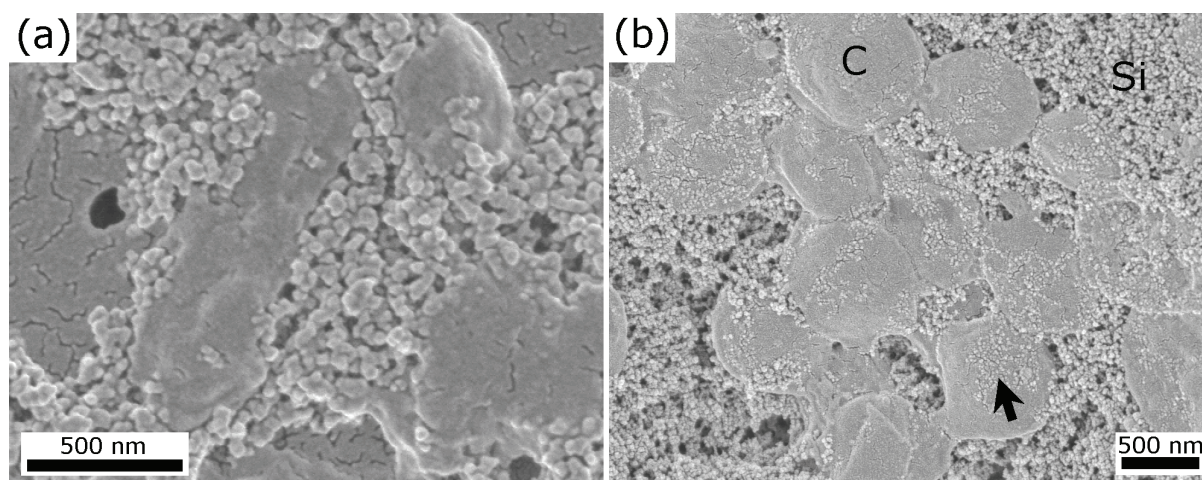


Fig. 4-1 : Micrographies MEB montrant les différents degrés de silicification après 9 mois pour (a) *Rhodovulum sp.* à température ambiante et (b) *P. abyssi*. Micrographies reprises des Figs. 3-13c et 3-4b.

### Fossilisation à 60°C

La fossilisation menée à température ambiante a montré que les cellules n'étaient pas affectées par le changement de pH et la forte concentration de silice, au moins pendant le premier mois de la fossilisation.

Ainsi la déformation rapide des cellules (constatée après seulement 24 heures de fossilisation à 60°C), et la baisse de leur nombre (constatée après un mois) peut sans conteste être attribuée à la température élevée puisque *Rhodovulum sp.* n'est pas thermophile, et pousse de manière optimale à température ambiante (entre 20 et 25 °C).

Les Bactéries non thermophiles peuvent supporter une légère augmentation de température (augmentation d'une dizaine de degrés) et réagissent rapidement en produisant des protéines spécifiques (HSP, *Heat-Shock Proteins*) (Yura *et al.*, 1993). Toutefois, quand la température devient trop élevée, les molécules organiques produites par la cellule pour son métabolisme sont endommagées, la membrane cytoplasmique s'effondre et la cellule meurt par lyse thermique (Madigan *et al.*, 2003). C'est vraisemblablement ce qui s'est produit après que *Rhodovulum sp.* ait été placée en étuve à 60°C. Les thermophiles ne connaissent pas ce problème car leurs protéines et enzymes sont bien plus résistantes à la chaleur.

Après un mois de fossilisation, sur les quelques cellules encore présentes, il y a quelques signes de précipitation de silice sur la paroi, mais ni plus ni moins que ce qui avait été observé lors de la fossilisation à température ambiante. La température de fossilisation ne semble donc pas avoir joué sur ce point. En revanche les précipités de silice sont différents à



60°C et à température ambiante, que ce soit par l'aspect ou la composition. Ce point sera discuté plus loin.

Comme dans le cas de *M. jannaschii*, le processus de silicification n'a semble-t-il pas été suffisamment efficace pour préserver les bactéries mortes, puisque seul un faible nombre était visible après un mois de fossilisation à 60°C. Les images MEB montrent toutefois par endroits ce qui pourrait être des restes de cellules (Fig. 3-14e).

Ainsi comme dans le cas de *P. abyssi* et *M. jannaschii*, le succès de la fossilisation expérimentale semble être lié à la capacité des micro-organismes à survivre un certain temps dans les conditions de la fossilisation expérimentale, le temps que la précipitation de précipitation de la silice soit suffisamment importante sur les parois pour garantir la préservation de la morphologie.

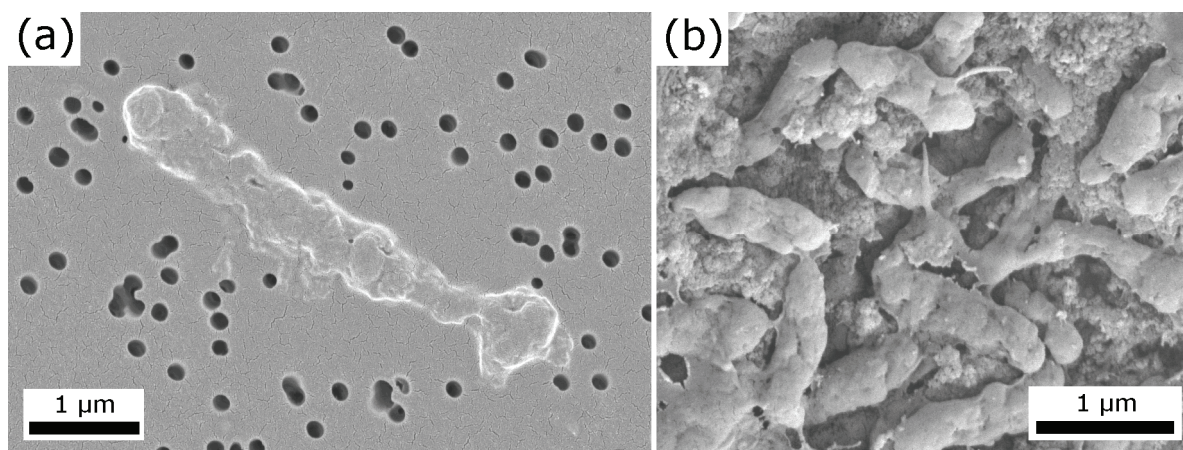
### **4.1.2.2. Silicification de *Geobacillus* sp.**

Comme mentionné dans la partie Résultats (cf. paragraphe 3.2.2.), les cellules ont souffert de leur culture interrompue par le transport entre Brest et Orléans. Les cellules, y compris à l'état naturel, ont déjà montré de forts signes de déformations (paroi plissée). A l'état naturel, la paroi de *Geobacillus* sp. est lisse (Ahmad *et al.*, 2000 ; Fortina *et al.*, 2001). Les cellules de *Geobacillus* sp. étaient donc pour la plupart très probablement mortes ou moribondes avant même l'injection de la silice.

A cause d'un souci dans la préparation de l'échantillon ayant été fossilisé pendant 24 heures, il n'a pas encore été possible de voir s'il y avait eu une éventuelle réponse des cellules à l'injection de la silice (par la production d'EPS par exemple) et donc de voir si dans la culture, certaines cellules étaient encore vivantes.

Malgré ce problème de culture, les cellules ont été très rapidement et très correctement fossilisées. La déformation des cellules qui a été observée sur les cellules non fossilisées ne s'est pas accentuée. Cette fossilisation, par sa rapidité et son intensité, n'a pas d'équivalent chez les autres souches de cette étude. Dès un mois elle concerne l'ensemble des cellules (Figs. 3-15c et d). Et après 10 mois de fossilisation, certaines d'entre elles étaient difficilement distinguables du précipité de silice. En comparaison, et dans le meilleur des cas, seule une fraction (entre un tiers et la moitié) de la paroi des cellules de *P. abyssi* apparaissait minéralisée au MEB, et dans une bien moindre mesure.

Dans le cas de *M. jannaschii* et de *Rhodovulum sp.* à 60°C, les cellules étaient certes vivantes au moment de l'injection de la silice, mais ont rapidement montré des signes de déformations et de lyse. On peut comparer l'état cytologique des cellules de *Geobacillus sp.* au début de la fossilisation avec celui des cellules de *Rhodovulum sp.* après 24 heures de fossilisation à 60°C (Fig. 4-2).



**Fig. 4-2 :** Micrographies MEB montrant (a) l'état cytologique médiocre des cellules de *Geobacillus sp.* après une culture mouvementée (repris de la Fig. 3-15b), et (b) des cellules de *Rhodovulum sp.* après 24 heures de fossilisation expérimentale.

L'absence de fossilisation des cellules de *M. jannaschii* et de *Rhodovulum sp.* (à 60°C) avait suggéré qu'une survie des cellules de ces souches dans les conditions de la fossilisation était nécessaire pour que la fossilisation ait le temps de se faire. La fossilisation effective de cellules de *Geobacillus sp.* visiblement déjà mortes nous oblige à nuancer cette hypothèse.

Ainsi, la mort des cellules en préalable ou dans les tout premiers temps de la fossilisation n'empêche pas nécessairement la fossilisation expérimentale, comme l'avaient suggérées les fossilisations de *M. jannaschii* et de *Rhodovulum sp.*

Le fait que les cellules de *Geobacillus sp.* soient mortes ou moribondes dès le début de la fossilisation a sans doute permis à la fossilisation de débiter plus rapidement. Les cellules n'ont pas pu déclencher de mécanisme protecteur contre la précipitation de silice, comme observé pour *M. jannaschii*. Mais ceci ne peut-être la seule explication de la rapidité et de l'intensité de la précipitation de la silice sur les parois de *Geobacillus sp.* : même après la mort des cellules, les fossilisations expérimentales de *Rhodovulum sp.* et de *P. abyssi* n'ont pas été aussi importantes, et n'ont pas eu lieu si rapidement.

Westall (1997) avait fossilisé expérimentalement *Bacillus laterosporus* (Gram-positif) et des plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* (Gram-négatives). La conclusion de cet auteur était que les Bactéries Gram-positives, avec leur enveloppe externe faite de peptidoglycane (riche en groupes fonctionnels carboxyles et phosphoryles), étaient plus promptes à fixer la silice que les Bactéries Gram-négatives, qui ont seulement une fine couche relativement inaccessible de ce peptidoglycane, car coincée entre deux membranes plasmiques. Les groupes fonctionnels sont de fait plus difficilement accessibles. La meilleure capacité des Gram-négatives par rapport aux Gram-positives à servir de sites de nucléation avait été dans un premier temps mise en évidence pour les ions métalliques (Ferris *et al.*, 1986). L'importance de la précipitation de la silice sur la paroi cellulaire de *Geobacillus sp.* (Gram-positif) comparée à celle à peine discernable sur les cellules de *Rhodovulum sp.* (Gram-négatif) va dans le sens de cette hypothèse (Fig. 3-16c).

L'étude de la fossilisation de cette souche est toujours en cours. Il est prévu des observations MET qui permettront de préciser la fixation de la silice sur les parois de *Geobacillus sp.*, l'état cytologique des cellules au début et durant la fossilisation, et de voir si la silice a également pénétré à l'intérieur de la cellule et précipité sur la paroi de la spore. Westall (1997) avait précédemment étudié la fossilisation d'une Bactérie sporulente, *Bacillus laterosporus* (non thermophile), et montré que la spore était, avec la paroi cellulaire, la seule structure cellulaire préservée.

### **4.1.2.3. Bilan de la fossilisation des Bactéries**

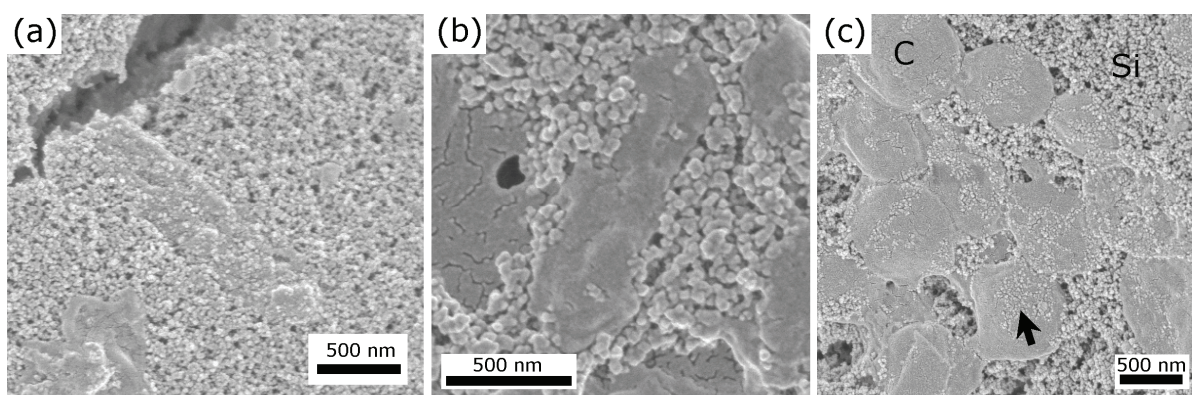
Les fossilisations expérimentales des Bactéries *Rhodovulum sp.* et *Geobacillus sp.* ont confirmé le résultat des fossilisations expérimentales précédentes. La fossilisation d'une bactérie Gram-négative dans une solution de silicate de sodium se fait de manière très douce, avec un dépôt très fin de particules nanométriques de silice sur les parois des micro-organismes, comme l'avaient constaté Toporski *et al.* (2002) lors de la fossilisation de *Pseudomonas fluorescens* et *Desulfovibrio indonensis*. La très bonne capacité des Bactéries Gram-positives à fixer la silice, déjà mise en évidence par Westall (1997), a également été illustrée par *Geobacillus sp.*

### **4.1.3. Aspects généraux**

#### **4.1.3.1. Influence de la membrane sur comportement lors de la silicification (comparaison Gram-positives / Gram-négatives / Archées)**

Cette étude a permis l'étude de la fossilisation expérimentale d'un panel de micro-organismes présentant les trois principales structures de parois connues (Bactéries Gram-positives / Bactéries Gram-négatives / Archées). Le détail de ces structures a été rappelé en introduction (cf. paragraphe 1.3.3.). Si l'on trouve chez les Archées de nombreuses structures de parois différentes (König, 2001), *P. abyssi* et *M. jannaschii* présentent toutes deux la plus simple configuration, avec uniquement une membrane plasmique entourée d'une S-Layer.

Vue au MEB, la précipitation de la silice sur les paroi de *P. abyssi* était bien moins importante que pour *Geobacillus sp.*, et légèrement supérieure ou équivalente à ce qui a été constaté chez *Rhodovulum sp.* à température ambiante (Fig. 4-3).



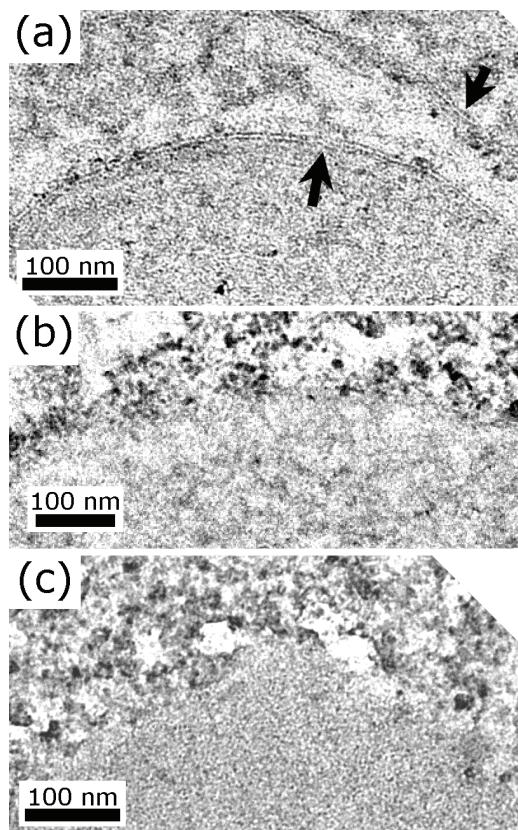
**Fig. 4-3 : Micrographies montrant des cellules de (a) *Geobacillus sp.*, (b) *Rhodovulum sp.* et (c) *P. abyssi*, piégées dans le précipité de silice, après 9 mois (pour *Rhodovulum sp.* et *P. abyssi*) et 10 mois (pour *Geobacillus sp.*) de fossilisation expérimentale. Les images sont reprises des Figs. 3-16a, 3-13c et 3-4b, respectivement.**

Comme expliqué plus haut, la différence d'intensité et de rapidité de la fossilisation entre *Geobacillus sp.* et *Rhodovulum sp.* s'explique par les différences de structure des parois des Bactéries Gram-positives et Gram-négatives, et des différences dans l'accessibilité et la quantité du peptidoglycane, riche en groupes fonctionnels pouvant fixer la silice.

Avec une Bactérie Gram-négative (*Rhodovulum sp.*) ayant son peptidoglycane difficilement accessible, et une Archée (*P. abyssi*) qui n'en possède pas, l'intensité de la



précipitation de silice sur les parois de ces deux micro-organismes est au final du même ordre de grandeur.



**Fig. 4-5 :** Micrographies MET montrant l'aspect de la paroi de cellules de *P. abyssi* après (a) 1 mois, (b) 4 mois, et (c) 1 an de fossilisation expérimentale. Les images sont reprises des Figs. 3-2d, 3-3f et 3-5h, respectivement.

précipité de silice (Fig. 4-5b et c). Au terme de la fossilisation expérimentale, la membrane plasmique n'était également plus discernable (Fig. 4-5c). Ceci suggère que la S-Layer puis la membrane ont effectivement servi de site pour la fixation de la silice. Westall *et al.* (1995) et Toporski *et al.* (2002) avaient déjà montré une précipitation des particules de silice sur la paroi de Bactéries organisé en réseau cristallin, et qui pourrait être le résultat de la fixation de silice suivant le réseau paracristallin des sous-unités de la S-Layer.

Malgré les différences de composition entre les parois des Archées et Bactéries, on note que le déroulement de la silicification pour l'Archée *P. abyssi* est similaire à ce qui a été décrit pour les Bactéries Gram-négatives (Toporski *et al.*, 2002), ou pour les Gram-positives (Westall, 1997), à vitesse et intensité moindres. La silice va dans un premier temps se fixer sur la surface extérieure de la cellule, avant de précipiter progressivement sur toutes les structures de la paroi. Au final, le cytoplasme se rompt et se vide, permettant ainsi à la silice

Cette étude, ainsi que les précédentes fossilisations expérimentales ayant utilisé des Bactéries Gram-négatives (Westall, 1997 ; Toporski *et al.*, 2002), montrent toutefois que la silicification peut se produire, et que donc les autres structures cellulaires peuvent servir de site pour la fixation de silice, même si l'efficacité est moindre qu'avec le peptidoglycane.

La S-Layer, qui est pratiquement ubiquiste chez les Archées et est constituée de glycoprotéines, semble fournir un possible site de fixation alternatif. Dans le cas de *P. abyssi*, elle constitue la couche extérieure de la paroi, et est donc directement exposée à la silice.

Cette S-Layer était visible sur les micrographies MET des cellules de *P. abyssi* après 1 mois de fossilisation (Fig. 4-5a), mais elle était par la suite invisible car intégrée au

de pénétrer à l'intérieur de la cellule. L'intensité de la silicification est, semble-t-il, également similaire pour l'Archée et la Bactérie Gram-négative.

#### **4.1.3.2. Fossilisation des EPS**

Au delà des cellules, la fossilisation expérimentale de ces différentes souches a permis de mettre en évidence le rôle important des EPS au cours de la fossilisation expérimentale.

Lors des observations au MEB, des EPS n'ont été vus que pour *M. jannaschii* et *Rhodovulum sp.*, que ce soit à l'état naturel ou au cours de la fossilisation expérimentale. Toutefois ces EPS montraient des aspects différents avant et après l'injection de la silice (*M. jannaschii*, Figs. 3-7a et 3-8a ; *Rhodovulum sp.* : Figs. 3-12b et 3-14a).

Ces EPS sont une des différences principales constatées entre les fossilisations des deux Archées. Dans le cas de *P. abyssi*, aucun EPS associé aux cellules n'a été observé avant ou après l'injection de la silice dans le milieu de culture. De l'autre côté, *M. jannaschii* se caractérisait par de copieuses quantités d'EPS, à la fois avant et après l'injection de silice.

Au final, sur la base des observations en microscopie électronique, il semble que ces EPS soient le seul produit microbien qui ait été silicifié lors de la fossilisation de *M. jannaschii* – les résultats des analyses de la matière organiques présentés plus loin apporteront une nuance à ce constat. La précipitation de la silice sur les EPS semble avoir été immédiate. Après seulement 24 heures, on observait un changement significatif dans la structure des EPS, d'un film homogène et dense à une structure en réseau, ouverte et alvéolaire. Les observations en microscopie électronique ainsi que les analyses de la matière organique (cf. paragraphe 4.4.3.1.) montrent qu'il y eu une importante production d'EPS lors des premières 24 heures de fossilisation. Cette structure alvéolaire demeure plus ou moins inchangée jusqu'à 1 an, avec seulement une légère augmentation de la taille des cristaux de silice.

La rapidité avec laquelle les EPS sont fossilisés a déjà été remarquée précédemment (Westall *et al.*, 1995, 2000). En effet, les EPS possèdent en général davantage de groupes fonctionnels disponibles pour la fixation de la silice que les enveloppes externes des cellules, et une surface réactive plus importante.

A l'état naturel, les cellules de *Rhodovulum sp.* étaient déjà liées entre elles par des EPS visqueux (Fig. 3-12b). De fort grandissement montraient également une fine dentelle de



sécrétions recouvrant les cellules. Avec cette matrice d'EPS et la forte densité de cellules constatée en microscopie optique, la communauté microbienne dans les flacons devait avoir une certaine cohésion. Ceci peut sans doute expliquer la conséquence spectaculaire de l'injection de la silice, où l'ensemble des cellules a précipité au fond des flacons, laissant derrière elle un surnageant limpide (Fig. 3-11). La silice en précipitant et en décantant a pu entraîner avec elle l'ensemble des cellules, liés par des EPS.

Ces EPS en dentelle, ou liant les cellules n'ont pas été observés lors de la fossilisation expérimentale. Toutefois des quantités importantes d'EPS ont été observées après seulement 24 heures de fossilisation à 60°C : EPS filamenteux liants les cellules, ou EPS en feuillets. Ce type d'EPS, et en si grande quantité, n'a pas été vu à l'état naturel ; il faut donc en conclure que les cellules ont également produit d'importantes quantités d'EPS pendant les 24 premières heures de la fossilisation expérimentale.

En revanche, aucun EPS n'a été observé lors de la fossilisation à température ambiante.

Au final, les seuls cas où d'importantes quantités d'EPS ont été vues lors des différentes fossilisations expérimentales de micro-organismes sont ceux où les cellules n'ont pas été préservées au final, à cause d'une lyse due à un stress osmotique (*M. jannaschii*) ou thermique (*Rhodovulum sp.*). De plus, dans ces deux cas, il y eu une importante production d'EPS en réaction au lancement de la fossilisation. Ceci montre que les micro-organismes ne sont pas souvent restés passifs face à la présence de silice, mais qu'ils ont réagi par différents mécanismes.

### **4.1.3.3. Réponse microbienne à l'injection de la silice**

L'injection de la silice directement dans les milieux de culture a permis de travailler avec des cellules qui étaient vivantes au début de la fossilisation, et avec des nutriments disponibles. Comme lors d'une fossilisation naturelle, les micro-organismes ont été laissés dans leur environnement. Il a donc été possible d'étudier la réaction microbienne à l'injection de la silice, et aux changements des conditions du milieu que cela a entraîné.

Les différents micro-organismes utilisés pour ces fossilisations expérimentales ont montré des comportements et des réactions différentes après le début de la fossilisation

expérimentale. D'un côté, *P. abyssi*, *Rhodovulum sp.* (à température ambiante) et *Geobacillus sp.* ne semblent pas avoir été marquées par l'injection de silice dans leur milieu, et sont restés vivantes (*P. abyssi* et *Rhodovulum sp.* seulement) au moins pendant le premier mois de la fossilisation expérimentale. D'un autre côté, *M. jannaschii* et *Rhodovulum sp.* (à 60°C) ont en moins de 24 heures montré des signes de non-tolérance aux nouvelles conditions du milieu (déformation, lyse). Y étaient associées d'importantes quantités d'EPS produites pendant les 24 premières heures de fossilisation. Comme constaté précédemment, il y a clairement un lien entre les deux phénomènes. Le nombre de cellules a ensuite très fortement baissé, allant même jusqu'à la disparition totale pour *M. jannaschii*.

La réaction à la fossilisation s'est faite de plusieurs manières :

### **Lyse des cellules**

Une lyse progressive des cellules a été constatée lors des fossilisation de *M. jannaschii* et de *Rhodovulum sp.*. Toutefois, il n'y a que pour l'Archée que la saturation en silice peut être mise en cause : la fossilisation à température ambiante de *Rhodovulum sp.* a montré que les cellules toléraient la présence de silice.

Le mécanisme de la lyse a été détaillé plus en amont (cf. paragraphe 4.1.2.3.). Dans le cas de *M. jannaschii*, il semble qu'elle soit le résultat d'une tentative active ou passive de réguler le déséquilibre osmotique entraîné par la présence de silice et la hausse du pH. Le déséquilibre étant trop fort à supporter pour cette souche fragile, la machine régulatrice s'emballe pour aboutir à la lyse.

### **Production d'EPS**

Lors des premières 24 heures de fossilisation, les cellules de *M. jannaschii* et de *Rhodovulum sp.* (à 60°C) ont produit d'importantes quantités d'EPS. Certaines études ont noté que la production d'EPS par les micro-organismes peut être une mesure protection dans les environnements extrêmes ou une réponse à un stress environnemental, comme les cheminées hydrothermales (LaPaglia & Hartzell, 1997 ; Johnson *et al.*, 2005). *M. jannaschii* est une des souches citées dans ces études.

LaPaglia & Hartzell (1997) ont ainsi pu évaluer la production d'EPS par l'Archée hyperthermophile *Archaeoglobus fulgibus* en réponse à différents stress (exposition à des substances toxiques, changements de pH et de température). Lorsqu'elle est cultivée dans les conditions idéales, cette espèce ne produit pas de quantités significatives d'EPS. Cette étude

conclut que la production d'EPS peut être induite, entre autres facteurs, par une hausse du pH ou de la température. La production d'EPS est effective chez *A. fulgibus* entre 2 et 12 heures après l'application du stress. Ce délai concorde avec la production d'EPS qui a été constatée après seulement 24 heures de fossilisation chez *Rhodovulum sp.* et *M. jannaschii*. LaPaglia & Hartzell (1997) ont également précisé le rôle protecteur des EPS. Ceux-ci pourraient protéger les cellules des effets d'une hausse du pH, et de la présence de composés toxiques.

De plus, lors d'une précédente fossilisation expérimentale, Lalonde *et al.* (2005) ont montré que la sécrétion d'EPS par les micro-organismes pouvait être un moyen de se protéger de la silicification. Phoenix *et al.* (2000) ont montré que la membrane de la cyanobactérie *Calothrix sp.* pouvait avoir un rôle similaire, servant de support à la précipitation de la silice, tandis que la cellule à l'intérieur de la gaine restait vivante.

La production d'EPS serait donc une tentative de la part des cellules de se protéger des conditions environnementales de la fossilisation (modification de l'équilibre osmotique, et saturation en silice pour *M. jannaschii* ; forte hausse de la température pour *Rhodovulum sp.*), ainsi qu'une tentative d'empêcher la précipitation de silice sur leurs parois.

La production d'EPS consécutive au début de la fossilisation n'a toutefois été notée que pour les souches qui produisaient déjà des EPS en l'absence de silice. *P. abyssi* n'a à aucun moment montré de signes d'une production d'EPS, soit qu'elle n'en ait pas eu besoin (pour l'adsorption de nutriments, ou la protection contre un stress), soit qu'elles ne sont naturellement pas capables de produire autant d'EPS que *M. jannaschii* ou *Rhodovulum sp.* De ce fait, si une importante production d'EPS est ici le signe d'un stress évident des cellules, on ne peut affirmer que l'absence de sécrétion traduit l'absence de stress.

### **Répulsion de la silice**

A différentes reprises au cours de la fossilisation expérimentales des micro-organismes, on pouvait noter que le précipité de silice n'était pas directement au contact de la paroi des cellules, mais qu'au contraire un espace vide de quelques dizaines de nanomètres entourait les cellules.

Ce phénomène a d'abord été observé sur les micrographies MET des cellules de *M. jannaschii* après 24 heures de fossilisation, où un espace d'une centaine de nanomètres séparait le précipité de silice de la paroi des cellules apparemment encore vivantes du

précipité de silice, tandis qu'il y avait un contact direct dans le cas des cellules lysées (Figs. 3-8d et e).

Des observations similaires ont été faites sur une cellule de *P. abyssi* après 1 mois de fossilisation (Fig. 3-2c), où la cellule était entourée d'un espace complètement vide d'une cinquantaine de nanomètres. Les images MEB des cellules de *P. abyssi* et *Rhodovulum sp.* (à 60°C) montrent également cet espace vide après 24 heures de fossilisation à 60°C (Figs. 3-1c et 3-14a).

Les méthodes de préparation des échantillons en microscopie électronique ne sont pas en cause. Les micrographies MET montre un net contraste entre cellules intactes et lysées de *M. jannaschii*, ainsi que des cellules de *P. abyssi* en contact direct avec le précipité de silice (Fig. 3-2a), écartant la possibilité d'un artefact. Enfin, les différentes images MEB montrant des cellules turgides en contact avec le précipité de silice, écarte la possibilité d'une rétraction en conséquence du séchage par la méthode du point critique. Dans le cas de *Rhodovulum sp.*, cet espace vide pourrait être une conséquence de la déformation et rétraction de la cellule à la suite du choc thermique. Le précipité de silice aurait conservé la forme des cellules avant leur déformation.

Lalonde *et al.* (2005) ont observé un phénomène similaire lors de la fossilisation expérimentale de *S. azorensis* et ont suggéré qu'une production continue d'EPS pouvait être un moyen d'éloigner la silice. Les fossilisations de *M. jannaschii* et *Rhodovulum sp.* à 60°C vont dans le sens de cette hypothèse. Dans les deux cas, les cellules ont produit une importante quantité d'EPS lors des 24 premières heures de la fossilisation. La mort des cellules signifierait l'arrêt de cette production, ce qui concorderait avec les images de cellules lysées en contact direct avec la silice. Toutefois, nous avons vu que, si la production d'EPS a pu être provoquée par la saturation en silice dans le cas de *M. jannaschii*, ce n'est pas le cas pour *Rhodovulum sp.*, où ils ont été produits à la suite du choc thermique. La capacité des EPS à fixer la silice aurait alors fourni aux cellules une protection indirecte contre la précipitation de silice en formant une barrière passive autour d'elles.

La protection active des cellules de *P. abyssi* contre la silicification, alors qu'aucun EPS n'a été observé aux côtés de cellules, montre que la sécrétion d'EPS n'est sans doute pas le seul moyen de défense à la disposition des cellules. Le fait que le précipité de silice suive à distance presque parfaitement le contour de la cellule (Figs. 3-1c, 3-2c, 3-8d) suggère la

présence d'un mécanisme répulsif au niveau de la paroi. Mais sur la base des seules images de microscopie électronique, il n'est pas possible d'identifier précisément ces mécanismes.

Ces mécanismes protecteurs ont été actifs tant que les cellules étaient vivantes. Toutefois, certaines espèces (*P. abyssi* et *Rhodovulum sp.*) se sont sans doute placées dans un état dormant après l'épuisement des nutriments, ce qui a dû diminuer l'efficacité de la protection. Par exemple, dans cet état dormant, la production continue d'EPS a dû être restreinte ou même arrêtée.

Pour des souches comme *P. abyssi* ou *M. jannaschii*, ce mécanisme pourrait être un moyen pour les cellules de survivre dans leur environnement naturel (au voisinage des fumeurs noirs) qui présente des quantités importantes de substances minérales et métalliques dissoutes.

### **4.1.4. Mécanismes de la silicification**

#### **4.1.4.1. Nature de la silice au cours de la fossilisation expérimentale**

La compréhension des mécanismes de la silicification nécessite de connaître l'état dans lequel se trouvait la silice aux différentes étapes de la fossilisation expérimentale.

La solution de silice utilisée pour cette étude est une solution pure de silicate de sodium ( $\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_7$ ) contenant 27% de silice et 10% de NaOH. Cette solution, ou un équivalent, a déjà été utilisée pour de précédentes fossilisations expérimentales (Birnbaum *et al.*, 1989 ; Toporski *et al.*, 2002 ; Yee *et al.*, 2003 ; Benning *et al.*, 2004a, 2004b ; Lalonde *et al.*, 2005). Ces études nous permettent de connaître l'état de la silice dans la solution de base, de connaître la nature du précipité qui s'est formé spontanément dans les milieux de culture après l'injection, et de savoir s'il restait de la silice dissoute dans les milieux après cette précipitation.

La grande quantité de NaOH présente dans la solution de base permettait d'atteindre un pH très élevé, et donc de dissoudre de grandes quantités de silice, dont le seuil de

saturation augmente avec le pH au delà de  $\text{pH} = 9$ . La silice dissoute y est présente sous forme du monomère  $\text{Si}(\text{OH})_4$  ou de son dimère. La dilution (10 fois) préalable à l'injection dans les flacons de culture n'a pas modifié les conditions de saturation, ni la nature de la silice dissoute.

Du point de vue de la solution de silice, son injection dans les milieux de culture a modifié plusieurs paramètres. En premier lieu, la concentration en silice a baissé pour atteindre approximativement 500 ppm. Ensuite, le pH a fortement baissé pour atteindre des valeurs proches de 7-8, et modifié par la même la valeur du seuil de saturation qui est descendu en dessous de 150 ppm.

En état de saturation, la silice a rapidement et spontanément polymérisé, pour former des phases polymériques, colloïdales, et précipitées. Cela correspond au précipité blanchâtre et floconneux qui s'est formé en quelques heures après l'injection de la silice dans les flacons de culture, et qui se présente sous la forme de particules nanométrique en microscopie électronique. Lalonde *et al.* (2005) ont montré que la présence de micro-organismes (et de leurs EPS) n'avait aucune influence sur cette polymérisation, sa cinétique ou son intensité, tandis que Birnbaum *et al.* (1989) avaient au contraire noté que la polymérisation était plus rapide en présence de micro-organismes.

Après cette polymérisation rapide, Lalonde *et al.* (2005) notent que la silice dissoute (monomérique ou légèrement polymérique) se stabilise à une concentration légèrement supérieure au seuil de saturation.

#### **4.1.4.2. Précipitation de la silice en présence ou absence de micro-organismes**

Le précipité de silice s'est formé en seulement quelques heures, à la fois dans les milieux contenant des cellules, et dans les échantillons témoins n'en contenant pas (Fig. 3-6). Cette précipitation était donc spontanée. Konhauser *et al.* (2004) font remarquer qu'en présence d'une grande concentration en silice, il y a une telle force conductrice pour la polymérisation de la silice qu'il n'y a pas besoin d'une catalyse microbienne. Toutefois, dans le cas de *M. jannaschii*, la précipitation de la silice s'est produite légèrement plus rapidement en présence de micro-organismes que dans les échantillons n'en contenant pas. Malheureusement, du fait de la forte densité cellulaire des cultures de *P. abyssi*, *Rhodovulum sp.* et *Geobacillus sp.* et du trouble important qu'elle causait, il n'a pas été possible de faire le même constat. Ceci est en accord avec les observations de Birnbaum *et al.* (1989). La matière



organique (cellules ou EPS) présente dans les milieux a pu faciliter passivement la nucléation de la silice dissoute, mais sans influencer sur le produit final et sa quantité.

Les précipités de silice, formés en présence ou non de micro-organismes dans les milieux de *M. jannaschii* et *P. abyssi* présentaient des différences de structures et de composition. Au final, deux types différents de précipités de silice ont été vus en microscopie électronique au cours des différentes fossilisations expérimentales.

Dans le cas de *M. jannaschii*, dans les milieux avec et sans cellules, le précipité montrait une structure alvéolaire, caractérisée par des filaments constitués de cristaux de silice d'environ 50 nm et des espaces (alvéoles) ovoïdes, irréguliers, de quelques microns en diamètre (Fig. 3-8a ). La seule différence entre les milieux avec et sans cellules est que, dans le premier cas, les EPS étaient clairement mélangés avec le précipité (comparer les Figs. 3-9c et 3-10a). Les spectres EDX montrent d'ailleurs un pic important du carbone (Fig. 3-9f). Bien que le signal du carbone puisse également venir du filtre de polycarbonate situé en dessous, le pic est nettement plus marqué que dans l'échantillon sans cellules (Fig. 3-10b). Un précipité de silice similaire, avec une structure alvéolaire, a également été observé lors de la fossilisation de *Rhodovulum sp.* à 60°C (Fig. 3-14e).

Dans le cas de *P. abyssi*, le précipité de silice, dans les milieux avec et sans cellules, était homogène, compact, poreux, et sans structure apparente. Les cristaux de silice étaient ici plus petits que dans le cas de *M. jannaschii*, et de l'ordre de 10 nm (Fig. 3-1c). Comme *P. abyssi* n'a pas produit d'EPS, il n'y a pas de différence notable en le précipité abiogénique et celui associé avec les cellules (comparer les Figs. 3-1c et 3-4c). Les précipités de silice lors des fossilisations de *Geobacillus sp.* et de *Rhodovulum sp.* à température ambiante montraient le même aspect compact et granuleux (Figs. 3-13c et 3-16a).

En ce qui concerne la composition, aucun autre composé que la silice n'a été identifié sur les spectres EDX obtenus sur le précipité compact, hormis un faible pic du sodium qui a été détecté lors des premières étapes de la fossilisation de *P. abyssi* (Fig. 3-1f), mais a disparu par la suite (Fig. 3-3d), ainsi que sur l'échantillon sans cellules (Fig. 3-4f). Ce sodium pourrait venir soit du milieu de culture (qui contient de grande quantité de NaCl) soit également de la solution de silicate de sodium utilisée. Mais cela n'explique pas pourquoi on ne le détecte plus lors de la suite de la fossilisation de *P. abyssi*, ni de manière récurrente dans les précipités de silice des autres espèces (*Rhodovulum sp.* et *Geobacillus sp.*).

A l'opposé, le précipité alvéolaire a souvent montré de nets pics du magnésium, que ce soit dans les échantillons avec ou sans cellules de *M. jannaschii* (Figs. 3-9f et 3-10a), ou lors de la fossilisation à 60°C de *Rhodovulum sp.* (Fig. 3-14g). L'origine la plus probable de ce magnésium est les milieux de culture de *M. jannaschii* et de *Rhodovulum sp.* qui contenaient respectivement 3 g/L et 2 g/L de chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ), contre seulement 0,2 g/L dans les milieux de *Geobacillus sp.* et *P. abyssi*.

Nesterchuk & Makarova (1970) ont montré que le chlorure de magnésium pouvait interagir avec une solution de silicate de sodium pour former un précipité de silice amorphe mélangé avec des silicates de magnésium hydratés. Les micrographies MET du précipité formé lors de la fossilisation de *M. jannaschii* ont montré deux composés granuleux différents et distincts : l'un dense aux électrons qui apparaît plutôt sombre, et un autre moins dense et aux grains plus fins qui apparaît grisé (Fig. 3-10c). Les spectres EDX ont montré qu'il s'agissait respectivement de silice et de silicate de magnésium (Figs. 3-10d et 3-10e).

Ces silicates de magnésium n'ont pas été détectés dans le précipité de silice formé lors de la fossilisation de *Rhodovulum sp.* à température ambiante. Ceci suggère que dans ces conditions expérimentales, une température élevée peut grandement faciliter l'interaction entre la silice et le magnésium.

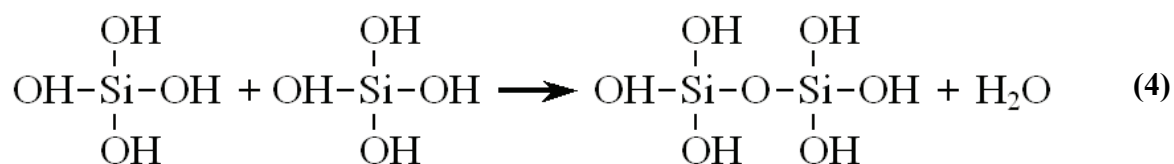
Selon Nesterchuk & Makarova (1970), l'ensemble du précipité qui se forme n'est pas constitué uniquement de silicate de magnésium. De la silice amorphe est également présente et est donc disponible pour la silicification des micro-organismes. Ainsi, le fait que ce type de précipité n'ait été observé que dans les cas où la fossilisation a échoué relève probablement de la coïncidence.

Il est intéressant de noter que le magnésium est le seul ion à avoir clairement interagi avec la silice. Aucune trace des autres composés du milieu de culture n'ont été trouvée sur les spectres EDX, notamment le chlorure de sodium pourtant souvent présent en grandes quantités (> 20 g/L).

#### **4.1.4.3. Mécanisme de fixation de la silice sur les EPS et les parois des micro-organismes**

A la suite de la polymérisation de la silice, cette dernière était présente dans le milieu sous forme dissoute, polymérique, colloïdale et précipitée. En polymérisant, la silice a formé des particules nanométriques (1-5 nm). Les groupes silanol ( $-\text{Si}-\text{OH}$ ) de chaque oligomère

peuvent se lier à d'autres groupes pour former des liaisons siloxane (-Si-O-Si-), perdant au passage une molécule d'eau (équation (4)). Ces polymères croissent ensuite très rapidement pour former des particules colloïdales plus grandes (> 5 nm).



Westall *et al.* (1995) et Lalonde *et al.* (2005) ont montré que ce sont uniquement ces fractions polymériques et colloïdales de la silice qui se fixent sur la paroi des micro-organismes. Lalonde *et al.* (2005) montrent de même que la polymérisation initiale de la silice qui a été constatée lors de la fossilisation expérimentale de *S. azorensis*, ainsi que des différents micro-organismes utilisés dans cette étude, est indépendante du processus d'immobilisation de la silice par les micro-organismes. Ainsi, cette polymérisation initiale et rapide ne fait que mettre la silice dans de bonnes conditions pour une fixation progressive. La préservation, ou non des structures organiques n'est donc pas conditionnée par cette précipitation, ce qui implique notamment que les EPS produits rapidement après l'injection de la silice seront considérés par la silice d'égal à égal avec les cellules et les EPS déjà présents avant l'injection.

Les signes d'une précipitation de silice sur la paroi des micro-organismes n'ont pas été immédiats. Dans le cas de *P. abyssi*, c'est seulement après 1 mois de fossilisation que les micrographies MET ont montré des signes non équivoque de la fixation de particules nanométriques de silice sur la paroi des micro-organismes. Malgré la différence de structure et de composition de la paroi des Archées, les mécanismes de la fossilisation semblent similaires à ce qui avait été déduit des précédentes fossilisations expérimentales, synthétisé par Konhauser *et al.* (2004) : les nanoparticules de silice (polymérique ou colloïdale) se sont liées à la paroi cellulaire par liaison hydrogène entre les groupes hydroxyles du polymère de silice et les groupes hydroxyles des molécules de la paroi. Un mécanisme similaire peut être invoqué pour la fixation de la silice sur les EPS de *M. jannaschii*. A l'instar des différences des cinétiques de fixation de silice entre Bactéries Gram-positives et Gram-négatives, un plus grand nombre de groupes fonctionnels disponibles ainsi qu'une surface réactive plus grande peut expliquer la rapidité de la fossilisation des EPS par rapport aux cellules. Les mécanismes

protecteurs évoqués précédemment y sont également pour quelque chose. La fine couche de silice observée au MET autour des cellules de *P. abyssi* après 1 mois de fossilisation (Fig. 3-2b) est ainsi probablement le résultat de cette première étape de l'immobilisation de la silice.

Après cette première étape, la suite de la fossilisation n'est qu'une poursuite de la polymérisation de la silice, et est totalement abiotique. C'est ainsi que lors de toutes les fossilisations expérimentales, la taille des grains de silice a progressivement augmenté, qu'ils soient fixés ou non sur des cellules, et quelque soit le type de précipité (compact ou alvéolaire). La croissance peut être le fait de la fixation d'autres particules de silice polymérique ou colloïdale, tout comme la fixation de silice monomérique dissoute.

Au final, les fossilisations expérimentales de cette étude confirment que les micro-organismes n'ont qu'un rôle passif sur le comportement de la silice. La polymérisation initiale de la silice n'est que le résultat de la forte concentration en silice – même si elle a été légèrement accélérée par la présence de matière organique qui a fournit des sites pour la nucléation. Si les micro-organismes ont parfois mis en œuvre des mécanismes actifs pour tenir la silice à distance, la fixation de particules nanométriques de silice sur les parois se fait passivement, et son intensité ne dépend que du nombre de groupes fonctionnels disponibles susceptibles d'accueillir la silice. Enfin, la croissance du précipité de silice entourant les cellules, n'est qu'une poursuite de la polymérisation, processus abiotique.

#### **4.1.4.4. Chronologie de la silicification, en relation avec la mort des cellules.**

Les différentes souches utilisées pour cette étude ont montré de nettes différences dans le déroulement et la chronologie de la silicification. Dans leur bilan de la fossilisation, Konhauser *et al.* (2004) précisait bien que la relation entre la cinétique de la silicification et la mort des cellules était absolument déterminante pour une préservation finale des micro-organismes.

De précédentes études ont montré que la silicification n'entraîne pas nécessairement la mort des cellules. Phoenix *et al.* (2000) ont ainsi montré que des cellules de la cyanobactérie *Calothrix sp.* demeuraient viables grâce à un renouvellement constant de sa gaine, sur laquelle la silice se fixait, et formait ainsi une protection.

Toutefois, il faut distinguer le cas des cyanobactéries, possédant une gaine, de celui des micro-organismes utilisés pour cette étude, qui n'en possèdent pas. Dans le premier cas, un équilibre est atteint, qui permet aux cellules de continuer de vivre dans un milieu saturé en silice. Dans le second cas, les fossilisations expérimentales de *P. abyssi* et *Rhodovulum sp.* (à température ambiante) suggèrent plutôt que la silicification n'entraîne pas tout de suite la mort des cellules. Les cellules sont restées vivantes plusieurs mois grâce à leur tolérance des conditions de fossilisation, d'éventuels mécanismes actifs de protection contre la silicification, et par leur passage dans un état dormant après l'épuisement des nutriments. Cette survie a permis de laisser le temps à la silicification de s'initier. Au final, la mort des cellules est la conséquence d'une fixation de silice sur les parois suffisamment importante pour bloquer les échanges entre la cellule et son environnement.

En parallèle, dans les cas où des cellules ont été préservées (*P. abyssi* notamment), un certain nombre de cellules étaient encore vivantes tandis que d'autres étaient déjà piégées dans la matrice de silice, avec des particules de silice fixées sur leur paroi. On peut en conclure que le processus de silicification n'a pas affecté l'ensemble des cellules simultanément, mais plutôt progressivement, sur une période de plusieurs mois. Les cellules moribondes ont également pu être plus rapidement silicifiées que les cellules vivantes, en raison des mécanismes de défense précédemment évoqués.

Pour les Archées et les Bactéries Gram-négatives fossilisées lors de cette étude, le processus de silicification a été assez lent, du fait des caractéristiques de la paroi (peu de groupes fonctionnels disponibles pour permettre la fixation de silice, cf. paragraphe 4.1.3.1.). Dans ce cas, la capacité des cellules à rester vivantes plusieurs mois dans les conditions de la silicification est primordiale. Celles qui ont toléré ces conditions (*P. abyssi*, *Rhodovulum sp.* à température ambiante) ont été préservées au final, tandis que celles qui sont mortes rapidement (*M. jannaschii*, *Rhodovulum sp.* à 60°C) ne l'ont pas été. Cela semble être de moindre importance pour les Bactéries Gram-positives, où la fixation de silice est plus rapide. Ainsi le fait d'avoir au départ de la fossilisation des cellules de *Geobacillus sp.* mortes ou moribondes n'a pas empêché la bonne préservation des cellules au final.

#### **4.1.5. Variations du mode opératoire**

La fossilisation expérimentale de différentes souches de micro-organismes dans le milieu de culture à une concentration de silice de 500 ppm a permis de préciser le déroulement d'une fossilisation expérimentale dans des conditions expérimentales se rapprochant des conditions naturelles. Toutefois à l'origine, le constat de l'absence de fossilisation des cellules de *M. jannaschii* a amené à douter de la validité du mode opératoire utilisé (injection de silice directement dans le milieu de culture). D'autres modes opératoires ont donc été envisagés et testés afin de lever ce doute. L'idée de départ était de suivre le plus fidèlement possible l'un des modes opératoires utilisés lors d'une précédente fossilisation expérimentale, validé par l'obtention d'une fossilisation efficace.

Entre temps, les résultats de la fossilisation expérimentale de *P. abyssi* avaient montré la validité du mode opératoire initialement utilisé. Malgré cela, ces variations du mode opératoire ont toutefois permis de confirmer et compléter nos données sur la silicification.

##### **4.1.5.1. Fossilisation dans une solution de silice pure**

Nous avons ainsi utilisé le mode opératoire de Toporski *et al.* (2002) qui avaient, avec succès, entrepris la fossilisation de *Pseudomonas fluorescens* et *Desulfovibrio indonensis* dans une solution pure de silicate de sodium à une concentration en silice de 5000 ppm.

La fossilisation dans une solution pure de silice entraîne quelques différences par rapport aux autres fossilisations expérimentales décrites ici, où les micro-organismes ont été fossilisés directement dans leur milieu de culture. Le fait de récupérer et rincer les cellules en fin de culture permet d'éliminer les composés du milieu de culture. Ceci prive donc les cellules de nutriments et entraîne rapidement leur mort ou un passage à l'état dormant, ce qui limitera en théorie la mise en œuvre de mécanismes protecteurs contre la silicification (production d'EPS entre autres). On évite également une interaction entre la silice et les composés dissous ou solides du milieu de culture, comme cela s'est produit avec le magnésium. Une bonne partie des EPS est également éliminée dans l'opération, hormis ceux liés aux cellules. La silice ne peut ainsi se fixer que sur les parois du flacon, sur le filtre Millipore utilisé comme support, ou les micro-organismes. Si les conditions de cette fossilisation expérimentale sont peu fidèles aux conditions naturelles, elles permettent en revanche une fossilisation plus « propre », moins sujette aux artefacts.



Contrairement aux fossilisations menées dans le milieu de culture, il n'y a pas eu de formation d'un précipité blanchâtre de silice, que ce soit lors de la préparation de la solution de silice, ou après le début de la fossilisation expérimentale. La silice a précipité de manière spontanée sur tous les supports disponibles, à la fois sur le filtre et les cellules.

Comme lors des fossilisations menées dans le milieu de culture (à des concentrations en silice de 500 ou 5000 ppm), les cellules de *M. jannaschii* ont lysé rapidement, après seulement 24 heures de fossilisation. Le fait que les cellules de *Rhodovulum sp.* et *P. abyssi* soient en bon état après une durée d'exposition à la silice identique illustre une fois de plus la fragilité des cellules de *M. jannaschii* lors de changements des conditions environnementales.

Après 24 heures d'immersion dans la silice, l'intensité de la précipitation de la silice sur les parois cellulaires était inversement proportionnelle à l'état apparent de la cellule (cellules lysées pour *M. jannaschii*, déformées par la chaleur pour *Rhodovulum sp.*, et intactes pour *P. abyssi*). On note tout de même une précipitation de silice sur des cellules lysées de *P. abyssi* après un mois de fossilisation. Cette lyse confirme que les cellules sont mortes assez rapidement. La silicification a donc commencé avec un léger décalage selon les espèces.

La silicification a pu commencer très rapidement pour *M. jannaschii*. A l'inverse, les cellules de *P. abyssi*, plus résistantes, ont pu mettre quelques jours à mourir, pendant lesquelles elles ont pu se protéger activement de la précipitation de silice. Ceci expliquerait le décalage constaté après 24 heures.

Malheureusement, la mise en œuvre de ce mode opératoire a souffert de quelques défauts qui ont empêché de d'étudier pleinement la fossilisation des micro-organismes dans ces conditions. Les cellules, fixées à l'origine sur le filtre Millipore, se sont pour la plupart remise en suspension au cours de la fossilisation. En conséquence, le nombre de cellules visibles au MEB était très limité.

Au final, toutefois, ces quelques images ont montré un comportement des micro-organismes similaire à celui observé lors des fossilisations menées dans le milieu de culture à une concentration en silice de 500 ppm : lyse des cellules de *M. jannaschii*, préservation et silicification des cellules de *P. abyssi*.

#### **4.1.5.2. Influence de la concentration en silice**

Les effets de la concentration en silice ont pu être testés sur *M. jannaschii* et *P. abyssi*, avec des objectifs différents pour chacune des souches.

Toporski *et al.* (2002) avaient montré, lors de la fossilisation de *Pseudomonas fluorescens* et *Desulfovibrio indonensis*, qu'une forte concentration en silice permettait une meilleure préservation des structures cellulaires (dont l'organisation de la membrane). De plus, toujours d'après cette étude, la concentration en silice serait un paramètre plus important que la durée de l'exposition à la silice pour une bonne préservation des micro-organismes. A de fortes concentrations en silice, la silicification serait plus rapide, et ne laisserait pas le temps aux cellules de se dégrader ou de lyser.

Ainsi dans le cas de *M. jannaschii*, nous voulions voir, après le constat de la non fossilisation des cellules à 500 ppm, si une concentration plus élevée pouvait permettre une fossilisation plus rapide, et donc une meilleure préservation des cellules.

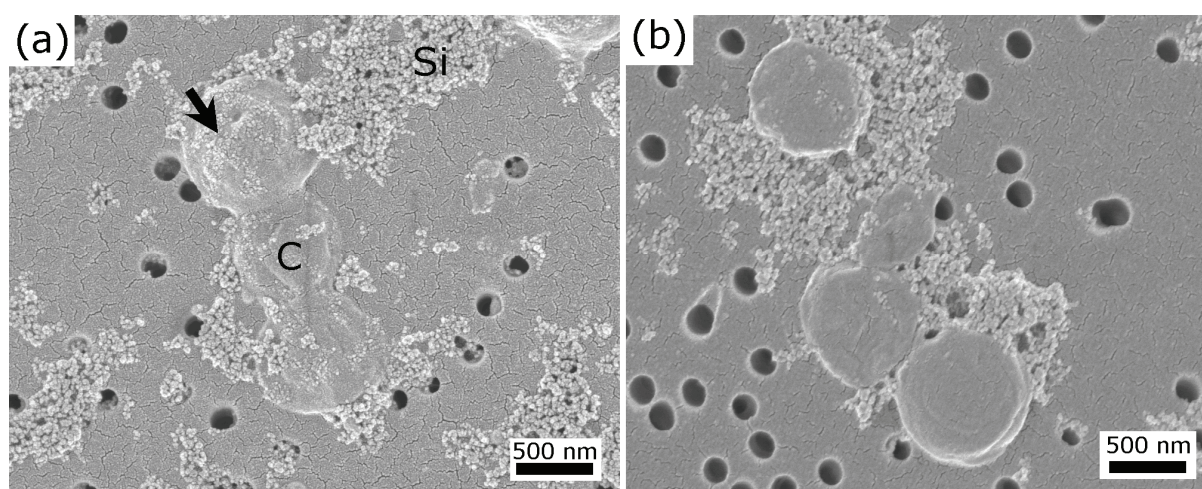
Si les micrographies MEB ont effectivement montré une précipitation de silice plus importante 24 heures seulement après l'injection de la silice, cela n'a pas empêché les cellules de lyser (Fig. 3-18b), pour les mêmes raisons certainement que lors de la fossilisation à 500 ppm. Toutefois, il est possible que cela ait permis une meilleure préservation des restes microbiens, puisque des structures organiques (ressemblant à des EPS, des fragments de cellules, ou des cellules lysées) ont pu être vues après 2 mois de fossilisation (Fig. 3-18f et g), là où la fossilisation à 500 ppm ne montrait que des EPS silicifiés.

Les seules cellules visibles après 24 heures de fossilisation étaient lysées. La lyse des cellules a donc sans doute été plus rapide avec 5000 ppm de silice qu'avec 500 ppm, où certaines cellules avaient survécu une semaine. Les causes de la lyse sont certainement les mêmes : la hausse du pH consécutive à l'injection de la silice (9,3 dans ce cas) ou un choc osmotique consécutif à la saturation en silice.

Cette lyse rapide des cellules indique que les cellules n'ont pas pu produire autant d'EPS à la suite de l'injection de la silice que ce qui avait observé et mesuré lors de la fossilisation avec 500 ppm de silice. Par conséquent, les structures observées après 2 mois de fossilisation sont plus probablement des restes cellulaires préservés ou des EPS produits avant l'injection de la silice.

Ainsi, si la plus forte concentration n'a pas évité la lyse des cellules, elle semble toutefois avoir été plus efficace pour préserver les restes bactériens.

L'objectif de la fossilisation de *P. abyssi* à une plus forte concentration de silice était différent. Toujours en exploitant l'idée émise par Toporski *et al.* (2002) que la silicification est plus rapide et la préservation des structures plus efficace à une plus forte concentration en silice, l'idée était de voir si au terme d'une fossilisation avec une concentration en silice de 5000 ppm, la silicification aurait été accélérée et s'il serait possible d'observer les cellules de *P. abyssi* à un stade de fossilisation très avancé, atteint seulement au bout de plusieurs années avec des concentrations en silice plus proches de la réalité.



**Fig. 4-6 : Micrographies MEB, montrant des cellules de *P. abyssi* exposées dans leur milieu de culture à une solution de silice (a) à 500 ppm, et (b) à 5000 ppm pendant 9 mois. Images reprises des Figs. 3-4a et 3-19a.**

Quand les observations en microscopie optique suggérait la présence de cellules de *P. abyssi* encore vivantes après plusieurs mois de fossilisation à une concentration de silice de 500 ppm, elles ne montraient au même stade que des cellules mortes à une concentration de 5000 ppm. Après l'injection de la silice, le pH du milieu est monté à 8,5 (contre 7,5 avec 500 ppm de silice), ce qui correspond à la limite supérieure de la gamme de pH supportable par *P. abyssi* (Erauso *et al.*, 1993). La hausse du pH n'est donc pas responsable de la mort des cellules.

Au terme de cette fossilisation expérimentale, les cellules ont été préservées, ne montrant que de faibles signes de déformation (Fig. 4-6). Le précipité de silice formé sur les cellules n'étant en revanche pas plus important que celui vu au même stade lors de la fossilisation à une concentration en silice de 500 ppm (Fig. 4-6).

Que ce soit pour *M. jannaschii* et *P. abyssi*, les observations au MEB n'ont pas montré de différences significatives dans l'aspect et la structure des précipités de silice, par rapport à ceux qui s'étaient formés avec une concentration initiale en silice de 500 ppm. Dans le premier cas, la structure alvéolaire était toujours présente, et les spectres EDX ont également montré qu'une interaction avec le magnésium s'était produite (Fig. 3-18a et c). Dans le second cas, on trouvait également un précipité compact formé de particules nanométriques de silice. La hausse de la concentration en silice ne semble pas avoir eu d'influence sur la taille de ces nanoparticules : leur taille est sensiblement la même (30-40 nm) quelque soit la concentration en silice de départ (Fig. 4-6).

Toutefois, la polymérisation de la silice consécutive à l'injection dans les flacons était bien plus importante à partir de 5000 ppm de silice. Ainsi, la quantité de silice polymérique et colloïdale formée, et disponible ensuite pour la silicification, devait être bien plus importante. Mais la similarité de la taille des particules nanométriques de silice montre que la concentration de départ n'a pas eu d'influence sur la cinétique de cette polymérisation.

La plus forte concentration en silice n'a donc pas accéléré la silicification, mais seulement permis d'avoir au départ un stock plus important de silice polymérique et colloïdale. Dans ces conditions, on peut donc considérer que la silice a pu occuper plus rapidement tous les groupes fonctionnels des parois cellulaires et des EPS. La rapidité de cette première phase de la fossilisation pourrait expliquer que les restes cellulaires de *M. jannaschii* ont été mieux préservés avec une concentration de départ de 5000 ppm, et que les cellules de *P. abyssi* soient mortes plus rapidement, étant plus rapidement recouverte d'une couche de silice qui bloque les échanges entre la cellule et l'extérieur. Enfin, si la hausse de la concentration initiale en silice ne modifie pas la cinétique de la polymérisation de la silice, alors il est normal que les cellules n'apparaissent pas davantage minéralisées à de plus fortes concentrations, comme observé dans le cas de *P. abyssi*.

Ces résultats confirment et précisent les conclusions de Toporski *et al.* (2002). A de plus fortes concentrations en silice, la silicification est plus efficace car la plus grande quantité de silice disponible permet une fixation uniforme plus rapide sur les structures organiques, et donc une préservation plus rapide. Mais cela n'a aucun effet sur la cinétique de polymérisation de la silice, et donc sur l'intensité de la minéralisation des cellules au final.

Cette étude est encore en cours, et il est prévu de préparer les échantillons pour le MET. Ceci nous permettra de préciser la qualité de préservation des micro-organismes au

cours de la fossilisation expérimentale à une concentration en silice de 5000 ppm. Il sera également possible de voir si la silice a pu, ou non, coloniser plus rapidement l'espace intercellulaire. La mort plus rapide des cellules dans ces conditions a en effet pu le permettre.

### **4.1.5.3. Bilan**

Le fait d'obtenir des résultats concordants avec trois modes opératoires différents est un élément important concernant la reproductibilité et la validité des résultats de ces fossilisations expérimentales. Konhauser *et al.* (2003) regrettaient que les précédentes fossilisations expérimentales aient été menées avec presque autant de modes opératoires différents, ce qui rendait difficile une vision d'ensemble des conclusions de ces différentes études. La comparaison des différentes méthodes et la reproductibilité des résultats permettent ainsi de se préserver d'éventuels artefacts. Ces études confirment qu'un schéma similaire de fossilisation se produit malgré les différences de mise en œuvre. De plus, chaque mode opératoire apporte des informations supplémentaires sur le processus de fossilisation, en mettant en avant certains phénomènes tout en masquant d'autres.

## **4.2. Adsorption et fixation d'ions métalliques par *M. jannaschii***

L'idée de tester la fixation d'ions métalliques était motivée par les études qui ont montré qu'une fixation de fer sur les parois de Bactéries peut favoriser la silicification des micro-organismes (Ferris *et al.*, 1988 ; Fein *et al.*, 2002). Cela se fait d'une part par l'inhibition des enzymes autolytiques, responsables de la dégradation des cellules après leur mort, laissant ainsi plus de temps à la silice pour se fixer et préserver les structures (Ferris *et al.*, 1988). D'autre part, quand la paroi des micro-organismes est chargée positivement, les cations métalliques peuvent servir d'intermédiaire entre des groupes fonctionnels chargés négativement, et les polymères de silice, eux aussi chargés négativement (Fein *et al.*, 2002). Avec les liaisons hydrogènes entre groupes hydroxyles décrit précédemment (cf. paragraphe 4.1.4.3), c'est le second mécanisme proposé pour la fixation de silice sur les structures organiques.

Les résultats de la fossilisation de *M. jannaschii* ayant montré une absence de fossilisation et une lyse des cellules, cette étude était donc d'abord destinée à vérifier que la paroi d'une Archée pouvait fixer des cations métalliques en solution, pour ensuite voir si la présence de fer pouvait avoir une influence ou non, sur le déroulement de la fossilisation et la préservation des cellules.

#### **4.2.1. Mécanismes de fixation et d'adsorption des cations métalliques**

Les images en microscopie électronique ainsi que les mesures de concentrations en ions métalliques par spectrométrie par absorption atomique ont clairement montré que ces cations avaient été immobilisés par *M. jannaschii*, et qu'ils s'étaient dans certains cas fixés sur les parois. Si la microscopie électronique n'a pu montrer la fixation des cations pour tous les métaux testés, elle fut secondée par les mesures par spectrométrie par absorption atomique qui ont montré une nette adsorption de l'ensemble de ces cations par les cellules de *M. jannaschii* (Tableau 3-XII).

Lors de leur travaux sur les Bactéries *Bacillus subtilis* (Gram-positive) et *Escherichia coli* (Gram-négative), Beveridge et ses collaborateurs (Beveridge & Murray, 1976, 1980 ; Beveridge & Koval, 1981) ont montré par microscopie et spectrométrie par absorption atomique une forte adsorption des cations métalliques par les composés de la membrane de ces micro-organismes.

Cette fixation se fait (i) par l'interaction entre l'ion métallique et un groupe fonctionnel de la paroi, et (ii) par le dépôt inorganique de quantité croissantes de métaux, au point de devenir discernable en microscopie électronique (Beveridge & Murray, 1980). Ces auteurs ont identifié les groupes carboxyles ( $-\text{COO}^-$ ) du peptidoglycane comme les principaux responsables de cette fixation (Beveridge & Murray, 1980). Ce peptidoglycane est davantage présent chez les Bactéries Gram-positives, et il est de plus rendu peu accessible chez les Bactéries Gram-négatives car placé entre deux membranes plasmiques. Ce qui explique que la fixation de métaux soit plus importante chez ces premières. Le groupe phosphoryle des lipides membranaires peut également permettre cette fixation.



La membrane des Archées en général et de *M. jannaschii* en particulier ne possède pas de peptidoglycane (cf. paragraphes 1.3.2.1. et 4.1.3.1.). La paroi de *M. jannaschii* n'est constituée que d'une membrane plasmique et d'une S-Layer. Malgré cela, les images au MET ont clairement montré la fixation de cations métalliques sur les différents composants de la paroi de *M. jannaschii*, ce qui indique la présence de groupes fonctionnels chargés négativement sur cette paroi.

Dans le cas du fer, les images en microscopie électronique ont clairement montré une accentuation du contraste de la S-Layer et de la membrane plasmique, signes que les cations  $\text{Fe}^{3+}$  avaient pu se fixer sur ces deux structures (Fig. 3-21c). De plus, des agrégats de particules sombres étaient visibles à l'intérieur des cellules, signe que les cations ont pu traverser la paroi et pénétrer dans le cytoplasme.

Dans le cas du plomb, la membrane et la S-Layer n'ont pas pu être identifiées avec précision (Fig. 3-21d). Toutefois, comme l'ensemble de la paroi montrait un fort contraste, il n'y a pas de doute que ses deux composants aient fixés les ions  $\text{Pb}^{2+}$ . Ces ions ont également traversé la paroi et pénétré à l'intérieur du cytoplasme. Enfin, les accumulations de dépôts sombres autour des cellules suggèrent une fixation de plomb par les EPS.

Malgré l'absence de peptidoglycane, différents groupes fonctionnels de la paroi de *M. jannaschii* et de ses EPS peuvent fixer les cations métalliques en solution. Si les lipides membranaires des Archées et des Bactéries sont différents, les groupes phosphates sont en revanche les mêmes (Fig. 1-5). Ils peuvent ainsi expliquer la fixation d'ions métalliques sur la membrane plasmique. La S-Layer est constituée de protéines et de glycoprotéines, les cations métalliques ont donc la possibilité de se fixer sur les groupes carboxyles de ces protéines (Schulze-Lam *et al.*, 1996). Moins contrastée que la membrane plasmique, la S-Layer possède sans doute moins de groupes fonctionnels disponibles pour la fixation des ions que la membrane. Enfin, les EPS sont composés majoritairement de polysaccharides et de protéines ; les cations ont pu également se fixer sur les groupements carboxyles des protéines (Schulze-Lam *et al.*, 1993, Chan *et al.*, 2004, Fortin, 2004).

Enfin, pour les autres métaux testés (calcium, cuivre et zinc), il n'a pas été possible de lever le doute quant à la nature cellulaire des structures observées. La coloration de coupes avec le citrate de plomb et l'acétate d'uranyle n'a pas permis d'augmenter le contraste des cellules. Cela signifie soit que ces formes ne sont que des artefacts et non des structures organiques, auquel cas il n'est pas surprenant que la coloration ne donne rien, soit que les cations métalliques se sont déjà fixés sur la majeure partie des sites où les cations issus de

citrate de plomb et l'acétate d'uranyle ( $\text{UO}_2^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$ ) pouvaient se fixer (au niveau de la paroi et du cytoplasme), auquel cas les colorants n'ont pas été efficaces. Lors de leurs travaux sur *B. subtilis*, dans des conditions expérimentales similaires à celles de notre étude, Beveridge & Murray (1976) avait observé que la coloration à l'acétate d'uranyle et citrate de plomb était encore efficace après que les fragments de paroi aient été exposés aux solutions métalliques, ce qui suggère que des sites étaient encore disponibles, ou que les ions  $\text{UO}_2^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  des colorants ont pris la place des ions métalliques déjà fixés. En considérant ceci, l'hypothèse la plus probable est que les structures observées ne sont pas des cellules, mais plutôt des artefacts.

En plus de la paroi, les images de microscopie électronique ont montré que les cations  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  avaient pu franchir la paroi et pénétrer dans le cytoplasme. Cultivée dans un milieu autotrophe, *M. jannaschii* utilise plusieurs cations pour son métabolisme (par exemple  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , cf. la composition du milieu de culture, paragraphe 2.1.2.1). Des mécanismes et des voies de passages existent donc et permettent aux cations de pénétrer à l'intérieur de la cellule. Puisque les ions métalliques ont pu rapidement et de manière significative se fixer sur la paroi et la traverser, il ne semble pas y avoir eu de mécanisme protecteur actif ou passif pour l'empêcher, comme cela avait été le cas pour la silice (cf. paragraphe 4.1.3.3.).

La fixation de cations sur la paroi de *M. jannaschii* indique a priori que celle-ci n'est pas chargée positivement, auquel cas les cations auraient été repoussés. A l'inverse, la fixation par liaisons hydrogènes de silice sur cette même paroi montre qu'elle n'est pas non plus chargée négativement. Ces différents résultats suggèrent donc que la paroi de *M. jannaschii* a globalement une charge neutre, avec la présence équilibrée de groupes fonctionnels chargés positivement et négativement.

### **4.2.2. Comparaison des taux d'adsorption des différents types de Procaryotes**

Les études de fixation d'ions métalliques par Beveridge *et al.* (1976, 1980, 1981) concernaient la Bactérie Gram-positif *Bacillus subtilis*, et la Bactérie Gram-négative *Escherichia coli*. Notre étude traite, pour la première fois à notre connaissance, de la fixation de métaux par une Archée. A l'instar de ce qui a été fait après la fossilisation expérimentale, il

## Discussion

est possible de comparer les capacités d'adsorption de ces trois types de Procaryotes. Cette comparaison est rendue possible par la similarité des modes opératoires utilisés lors de ces différentes études (Tableau 4-I).

**Tableau 4-I : Comparaison des différents modes opératoires pour l'étude de l'adsorption de cations métalliques par les micro-organismes.**

<i>Souches utilisées</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (Bactérie Gram +)	<i>E. coli</i> (Bactérie Gram -)	<i>M. jannaschii</i> (Archée)
<i>Référence</i>	(Beveridge & Murray, 1976)	(Beveridge & Koval, 1981)	-
<i>Type d'échantillon</i>	Fragments de paroi	Fragments de paroi	Cellules entières
<i>Concentration initiale en ions métalliques</i>	5 mM	5 mM	10 mM
<i>Température et durée d'exposition</i>	T°C ambiante – 10 min	T°C ambiante – 10 min	60°C – 1 h

Les données d'adsorption des différents ions métalliques par ces deux Bactéries sont exprimées en  $\mu\text{M}$  adsorbé par mg de cellules. Dans notre cas, nous ne disposons que de résultats exprimés en  $\mu\text{M}$ . Il n'a pas été possible d'obtenir une valeur précise du nombre de cellules présentes dans les cultures de *M. jannaschii*. Nous ne pouvons donc faire que des estimations.

Une tentative de détermination de la quantité de cellules dans une culture de *M. jannaschii* obtenue dans un milieu autotrophe nous a donné un poids humide de 17,9 mg/L. Cette valeur sous-estime sans doute la quantité réelle de cellules. Même dans des conditions optimales (milieu hétérotrophe, culture en réacteur), on ne peut obtenir de grandes quantités de *M. jannaschii*. Mukhopadhyay *et al.* (1999) cite un maximum de 500 mg/L pour des cultures en réacteur.

Ainsi, pour pouvoir comparer les résultats de l'adsorption de métaux par *M. jannaschii* avec ceux de *B. subtilis* et *E. coli*, il faut considérer que la masse de cellules présentes dans le milieu en fin de culture se situait quelque part entre ces deux valeurs. 10 mL de culture ont été utilisés pour chaque étude, ce qui équivaut à une quantité de cellules située entre 0,179 et 5 mg.

**Tableau 4-II : Comparaison des taux d'adsorptions obtenus pour les différents types de micro-organismes.**

	<i>Bacillus subtilis</i> (Bactérie Gram +) (Beveridge & Murray, 1976)	<i>E. coli</i> (Bactérie Gram -) (Beveridge & Koval, 1981)	<i>M. jannaschii</i> (Archée)		
	μM / mg	μM / mg	μM	μM/mg (17,9 mg/L)	μM/mg (500 mg/L)
<i>Fer III (Fe<sup>3+</sup>)</i>	3,581	0,200	4441	0,249	0,009
<i>Calcium (Ca<sup>2+</sup>)</i>	0,399	0,035	80	0,004	0,0002
<i>Plomb (Pb<sup>2+</sup>)</i>	0,020	0,152	211	0,012	0,0004
<i>Zinc (Zn<sup>2+</sup>)</i>	0,701	0,390	92	0,005	0,0002
<i>Cuivre (Cu<sup>2+</sup>)</i>	2,990	0,090	362	0,020	0,0007

Cette comparaison (Tableau 4-II) montre que la quantité d'ions métalliques adsorbés par *M. jannaschii* est nettement inférieure aux valeurs obtenues pour *B. subtilis* et *E. coli*, quelque soit l'estimation (optimiste ou pessimiste) de la quantité de cellules présente dans les cultures. Beveridge & Fyfe (1985) avaient constaté que *E. coli* n'adsorbait qu'environ un dixième de la quantité de métaux adsorbés par *B. subtilis*, en raison des différences des parois entre Bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Si l'on suppose que ces résultats peuvent être comparés avec ceux de *M. jannaschii*, alors ils semblent montrer que *M. jannaschii* n'adsorberait au mieux qu'un dixième de la quantité de métaux adsorbés par *E. coli*.

Après les résultats de la fossilisation, ces résultats tendraient à confirmer la faible capacité de la membrane de *M. jannaschii* à fixer des composés minéraux.

#### **4.2.3. Influence de la fixation de fer sur la silicification**

Après une fixation de fer et deux mois de fossilisation, les images MEB n'ont pas permis d'observer des cellules préservées ou des restes de cellules de *M. jannaschii*. Toutefois, les cellules, en relativement faible nombre à la base, ont pu être masquées par les dépôt important de silice et fer mêlés. De ce fait, il est sans doute prématuré de conclure à une non-préservation des cellules.

Avec la fixation d'ions Fe<sup>3+</sup> la paroi de *M. jannaschii*, la fixation de silice sur ces ions Fe<sup>3+</sup> peut être envisagée. Toutefois, la quantité de métaux fixés par l'Archée ne semblant pas

être très importante, par comparaison avec les Bactéries, on peut douter de l'efficacité de ce mécanisme. Toutefois, les ions  $\text{Fe}^{3+}$ , par leur capacité à inhiber les enzymes autolytiques (Ferris *et al.*, 1986), pourraient prévenir la dégradation des cellules de *M. jannaschii*, laissant ainsi le temps à la silice se déposer.

Il est donc nécessaire de poursuivre les études de l'influence de la fixation de cations métalliques en général, et du fer en particulier sur la silicification. *M. jannaschii* avec sa lyse rapide lors de la silicification est un bon sujet d'étude. On peut également envisager une étude similaire avec *P. abyssi*.

### **4.3. Fossilisation expérimentale des tapis microbiens d'Octopus Spring (Yellowstone)**

L'étude et la compréhension de la fossilisation expérimentale d'un tapis microbien naturel est de loin plus complexe que dans le cas d'une culture mono-souche obtenue en laboratoire. En effet, le tapis microbien contient quelques dizaines d'espèces de micro-organismes différents (cf. paragraphe 2.1.3.1.). Le tapis possède son organisation propre, avec des variations suivant l'épaisseur et la localisation. A l'inverse d'une culture en suspension, les tapis ont une cohésion, de part la grande quantité d'EPS sécrétés par les micro-organismes. Tout ceci concourt à l'aspect complexe des tapis. De plus, ce tapis a été prélevé dans un environnement déjà riche en silice. Ainsi, dans le cas d'une silicification expérimentale, il est impératif de savoir faire la différence entre la silice naturelle, déjà présente au moment du prélèvement, et celle « artificielle » qui est issue de la précipitation de silice au cours de la fossilisation. Autre différence avec une culture de laboratoire (qui ne contient que des cellules en pleine croissance), le tapis microbien regroupe une communauté microbienne active, qui contient donc des cellules vivantes côtoyant des cellules mortes. Lorsque l'on étudie les conséquences de la fossilisation, il faut savoir reconnaître ce qui est dû à une dégradation naturelle, ou à une dégradation provoquée par le processus de fossilisation.

#### **4.3.1. Fossilisation expérimentale d'un tapis microbien vivant**

##### **4.3.1.1. Fossilisation et préservation des filaments de *Chloroflexus***

Lors de la fossilisation du tapis microbien prélevé au site n°3, des signes de précipitation de silice sur les filaments de *Chloroflexus* sont apparus après deux semaines au MEB et MET, par la présence d'une minéralisation des filaments plus importante qu'à l'état naturel (Fig. 3-28a) et l'apparition de particules de silice nanométriques dans l'espace intercellulaire (Fig. 3-28c). Comme il en sera discuté plus tard, de par le pH élevé de la solution, la précipitation de la silice n'a pas dû être très importante au départ, mais s'est plutôt accélérée avec le temps et la baisse du pH. Les filaments de *Chloroflexus* ont été dans l'ensemble bien préservés au terme de la fossilisation expérimentale. Les premiers signes de déformation des filaments ont été constatés seulement après 1 an de fossilisation.

Les micrographies MET ont montré une progression de la fixation de silice par les micro-organismes : d'abord présente dans l'espace intercellulaire (Fig. 3-28c), elle était, après 5 mois de fossilisation, présente en abondance dans l'entourage des cellules (Fig. 3-30, l'ensemble de la planche), fixée sur la gaine (Fig. 3-29c), et parfois même également fixée sur la paroi des cellules (Fig. 3-30d). Aucune nanoparticule de silice n'a toutefois été observée à l'intérieur du cytoplasme. Cette progression est également visible au MEB, où de plus en plus de filaments montrent des signes importants de fixation de silice (Fig. 3-29c, après 5 mois de fossilisation ; 3-31a, après 1 an).

La silicification des filaments est hétérogène. Ainsi, après 5 mois de fossilisation expérimentale, les micrographies MEB et MET ont montré des filaments cernés de silice côtoyant des filaments vierges de toute minéralisation (Fig. 3-29c pour le MEB, et Fig. 3-30d pour le MET). Toutefois après un an de fossilisation, les observations MEB suggèrent que cette différence s'est estompée, les filaments étant tous plus ou moins affectés par la précipitation de silice (Fig. 3-31a).

La procédure de préparation des échantillons pour le MEB pourrait cependant expliquer en partie cette hétérogénéité apparente. La gaine fibreuse, qui était observée systématiquement autour des filaments au MET, n'a été vue que dans de rares cas au MEB (Fig. 3-38c). Tout comme les EPS, la gaine a certainement été détruite par lors du séchage par



la méthode du point critique. Par conséquent, les cas où une précipité de silice est visible au MEB sur les filaments (Fig. 3-30c), correspondraient à une précipitation de la silice sur la paroi, comme cela été observé au MET (Fig. 3-31d).

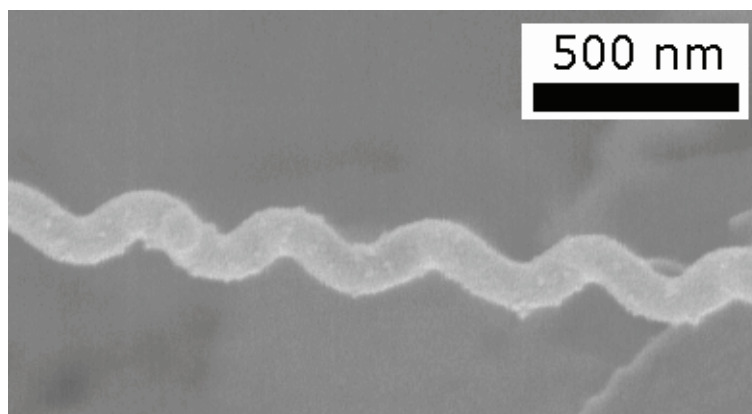
Les micrographies MET ont toutefois montré que l'hétérogénéité de la silicification était bien réelle, et pas uniquement le fait d'artefacts lors de la préparation des échantillons.

### **4.3.1.2. Fossilisation et préservation des autres micro-organismes**

L'objectif de cette étude était le suivi de la fossilisation des filaments de *Chloroflexus*. Toutefois, nous l'avons vu, d'autres espèces de micro-organismes sont présentes dans le tapis, et ont donc été fossilisées. Si les observations MEB et MET n'étaient pas ciblées sur ces souches, elles apparaissent toutefois sur un certain nombres d'images, qui permettent de faire un petit bilan de leur fossilisation, et peuvent fournir des éléments de comparaison avec *Chloroflexus*.

Après 5 mois de fossilisation expérimentale, des bâtonnets, fortement déformés, de *Synechococcus* montraient sur les micrographies MEB des signes d'une légère précipitation de la silice sur leur paroi (Fig. 3-30d). La fixation de silice sur les bâtonnets de *Synechococcus* était bien moins importante que celle observée sur certains filaments de *Chloroflexus* (comparer les Figs. 3-29c et d).

Ces bâtonnets de *Synechococcus*, de même que les autres espèces de micro-organismes, n'ont pas été observés au MET au cours de la fossilisation expérimentale. L'identification des filaments de *Chloroflexus* était facilitée par leur grand nombre. Si la présence d'autres types de micro-organismes a été notée sur les sections ultrafines, leur faible nombre n'a permis ni de les rapprocher avec certitude des espèces observées au MEB, ni de faire un suivi détaillé de leur comportement au cours de la fossilisation.



**Fig. 4-7 :** Micrographie MEB montrant un spirochète présent dans le tapis à *Chloroflexus* du site n°3, exposé à une solution de silice à 500 ppm pendant 1 an. Noter les fines particules de silice fixées sur la paroi.

La plupart de ces espèces précédemment observées (bâtonnets de toutes tailles, spirochètes, coques) étaient présentes dans le tapis bactérien après un an de fossilisation, indiquant une préservation de ces micro-organismes, et montraient dans certains cas des légers signes de précipitation de la silice (Fig. 4-7) et de déformation.

#### **4.3.1.3. Fossilisation et préservation des EPS**

Les observations en Cryo-MEB (Fig. 3-26e et f) ont montré l'importance de la matrice d'EPS dans les tapis prélevés. Ces EPS constituent donc, par leur abondance et leur surface, un important site de fixation potentiel pour la silice.

A l'état naturel, la matrice d'EPS au sein du tapis ne montrait pas de signes d'une importante minéralisation. Au MEB, seuls quelques grains de silice étaient présents ci ou là (Fig. 3-26b), tandis que le Cryo-MEB n'en montrait pas (Fig. 3-26f). Le MET montrait en revanche un certain nombre de grains de silice d'une cinquantaine de nanomètres présents entre les cellules (Figs. 3-27a et 3-27d), probablement fixés ou adsorbés par les EPS. Après seulement 2 semaines de fossilisation, on notait l'apparition de particules nanométriques de silice fixées sur les EPS. Leur nombre augmentait avec le temps, donnant aux EPS un aspect de plus en plus granuleux (Fig. 3-29a).

Les EPS semblent avoir été particulièrement bien préservés. Ainsi au terme de la fossilisation, il était toujours possible de distinguer leur fine structure fibreuse, malgré la fixation de la silice (Fig. 3-31b).

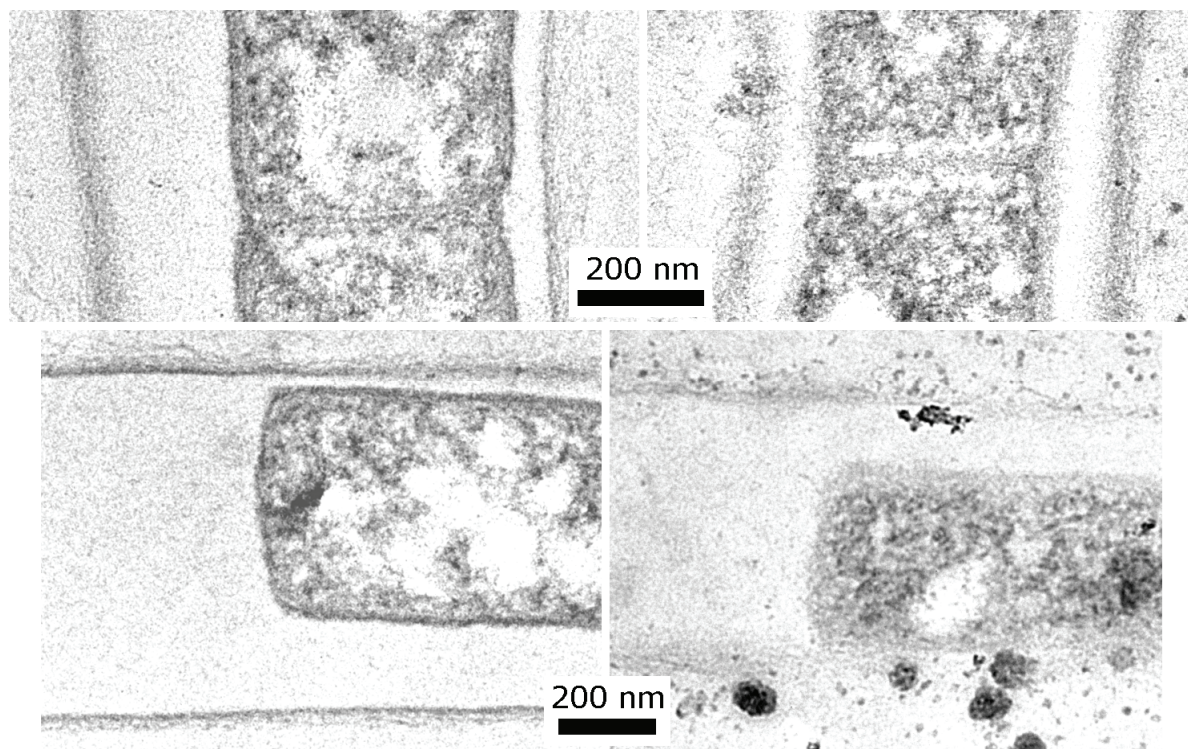
#### 4.3.1.4. Réponse microbienne à la présence de silice

Dans leur environnement naturel, les filaments de *Chloroflexus* sont déjà exposés à de fortes concentrations en silice (140 ppm à Octopus Spring, et presque 500 ppm au Strokkur, Islande ; Schultze-Lam *et al.*, 1995). Il n'est donc pas surprenant que, contrairement aux souches cultivées en laboratoire et fossilisées ensuite, les observations en microscopie électronique n'aient pas montré de comportements particuliers des filaments de *Chloroflexus* en réaction avec la présence de silice. *M. jannaschii* et *Rhodovulum sp.* avaient réagi à l'injection de silice par une importante production d'EPS, et par un mécanisme actif qui repoussait la silice et permettait d'éviter la fixation de silice sur la paroi.

Dans le cas du tapis à *Chloroflexus*, il est impossible de déterminer sur la seule base d'observations en microscopie électronique si des EPS ont été produits à la suite de l'immersion dans la solution de silice, du fait de l'importante matrice d'EPS déjà présente à l'origine.

Un mécanisme répulsif similaire à celui observé chez *M. jannaschii* n'a pas été observé. En revanche, il apparaît que les particules de silice ont été effectivement tenues à distance par l'intermédiaire de la gaine fibreuse. Cette gaine semble en effet avoir formé un barrage aux nanoparticules de silice, comme en témoignent les micrographies MET montrant nombre de particules fixées à l'extérieur de la gaine tandis que l'intérieur en est vide (Fig. 3-30c). Schultze-Lam *et al.* (1995), lors de leur étude de la fossilisation naturelle de filaments de *Chloroflexus*, avait également constaté que, dans des conditions naturelles, la silicification restait dans un premier temps limitée à l'extérieur de la gaine des filaments de *Chloroflexus*.

En comparant les micrographies MET prises au cours de la fossilisation expérimentale (Fig. 4-8), peu de changements sont à noter au niveau de la gaine des filaments. Aucun épaissement significatif n'a été observé, hormis une légère distension des fibres qui composent cette gaine. Comme cela a été suggéré par Schultze-Lam *et al.* (1995), il est possible qu'un certain nombre de fibres composant la gaine se détachent au cours de la fossilisation, et soient remplacées par de nouvelles fibres produites tant que la cellule reste vivante, maintenant ainsi une épaisseur constante de la gaine.



**Fig. 4-8 :** Micrographies MET montrant et les septa et les extrémités des filaments de *Chloroflexus*, ainsi que la gaine, à l'état naturel (à gauche), et après 5 mois de fossilisation expérimentale (à droite). Pour chaque paire d'image, l'échelle est identique.

Un phénomène similaire a été constaté par Phoenix *et al.* (2000) lors de la silicification de la cyanobactérie *Calothrix sp.* Dans ce cas, la gaine permet aux micro-organismes de vivre dans un environnement où se produit une minéralisation importante. En faisant barrage aux particules nanométriques de silice, elle permet d'éviter la précipitation de silice sur la paroi.

On peut supposer un rôle similaire de la gaine des filaments de *Chloroflexus*. Même avec un grand nombre de particules de silice présentes autour des cellules et sur l'extérieur de la gaine, les filaments sont intacts d'un point de vue cytologique, et certainement encore vivants. Cette gaine protège donc la cellule contre la silicification. Dans l'environnement naturel, cette gaine pourrait également tenir à distance des filaments la grande quantité d'espèces minérales dissoutes dans les eaux des sources chaudes.

L'épaisseur de la gaine fibreuse de *Chloroflexus* (moins de 100 nm) est toutefois infime par rapport à celle de *Calothrix sp.* (supérieure au micron). L'efficacité de la protection doit certainement être bien inférieure. Après 5 mois de fossilisation, on note en effet un certain nombre de cellules présentant une fixation de particules de silice très petites sur leur paroi (Fig. 3-30d). Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer et préciser le rôle protecteur de cette gaine et les mécanismes mis en œuvre.

#### **4.3.1.5. Survie des micro-organismes au cours de la fossilisation expérimentale**

Pour des raisons pratiques, la fossilisation expérimentale des tapis microbiens a dû être effectuée à température ambiante (autour de 20-25°C). Pierson & Castenholz (1974) précisent que la température inférieure pour la croissance de *C. aurantiacus* est de 30-35°C. Il n'y a donc pas pu y avoir de croissance des filaments après le lancement de la fossilisation. Cette température n'a sans doute pas entraîné la mort des cellules, mais celles-ci ont pu vivre avec un métabolisme limité ou se mettre en dormance, à l'instar de *P. abyssi* (cf. paragraphe 4.1.1.1.). De ce fait, la production d'EPS après le prélèvement et le début de la fossilisation a très certainement dû être limitée.

Les prélèvements de tapis ont été plongés dans une solution pure de silice, dépourvue des nutriments (ions, molécules organiques) qui sont d'ordinaire renouvelés par des apports permanents de l'eau de source. Le tapis en lui-même peut toutefois être une source de nutriments pour les cellules. Des éléments minéraux ont pu être conservés dans l'eau interstitielle, et fournir une réserve limitée. Les restes microbiens ont également pu être une source, plus durable, de nutriments. Les EPS (présents en grand nombre dans les tapis) peuvent également être utilisés comme source de nutriments par les micro-organismes (Zhang & Bishop, 2003). Ces derniers peuvent dégrader leurs propres EPS s'ils sont en manque de nutriments. Ainsi, si l'autotrophie n'était pas possible sur le long terme, on peut considérer l'hétérotrophie comme une possibilité pour assurer les faibles besoins des cellules.

A cela s'ajoute la protection fournie par la gaine fibreuse des filaments. Les filaments de *Chloroflexus* ont ainsi pu rester vivants plusieurs mois dans les conditions expérimentales. Les observations MET montrent ainsi de nombreux filaments intacts après 5 mois de fossilisation expérimentale (Fig. 3-30a), tandis que les images MEB montrent des filaments clairement déformés, et probablement morts, après 1 an de fossilisation (Fig. 3-31a).

#### **4.3.1.6. Evolution du pH au cours de la fossilisation**

Lors de la fossilisation du tapis du site n°1, le pH de la solution de silice a progressivement baissé, partant des environs de 10 pour se stabiliser vers 7,5 après 5 mois de

fossilisation. Le tapis est clairement à l'origine de cette baisse puisque dans le même temps le pH du témoin (solution de silice à une concentration de 500 ppm, sans tapis) est resté à 10.

Dans le cas de la fossilisation du tapis prélevé au site n°1 (cf. paragraphe 4.3.2.), le pH n'a pas immédiatement baissé : la baisse du pH n'est donc pas due à la seule présence du tapis. Les observations en microscopie électronique ont montré que les prélèvements du site n°3 comportent une grande quantité de micro-organismes vivants (Fig. 3-26a), ce qui n'est pas le cas pour le site n°1, où une bonne partie du tapis contient des micro-organismes morts ou moribonds (3-32a). Ceci suggère que l'activité microbienne serait responsable de la baisse du pH.

Du fait de la masse importante (1-2 g) du prélèvement, et du fait que la fossilisation s'est faite dans un environnement confiné (20 mL de solution de silice), les micro-organismes vivants ont pu, même avec un métabolisme limité, modifier le pH de l'environnement restreint pour le ramener progressivement vers des valeurs plus conforme à leur environnement naturel (autour de 8).

### ***4.3.1.7. Précipitation de la silice, et mécanismes de fixation sur les cellules et EPS***

#### ***Nature de la silice au cours de la fossilisation expérimentale – conditions de saturation de la silice***

La baisse du pH tout au long de la fossilisation expérimentale a eu une influence sur la saturation du milieu en silice.

A l'origine, le pH n'a pas été modéré et était égal à 10 au début de la fossilisation expérimentale. Différents rapports situent la solubilité de la silice à pH 10 entre 300 et 500 ppm (Iler, 1979). Il est donc possible qu'au début de la fossilisation, le milieu n'était pas saturé en silice, ou légèrement sursaturé.

Les témoins sans micro-organismes n'ont pas montré de polymérisation spontanée de la silice, comme cela avait été observé lors des fossilisations expérimentales menées dans les milieux de culture, avec la formation d'un précipité blanchâtre de silice quelques heures après l'injection de la silice. Par conséquent, la polymérisation de la silice n'aurait pas été possible sans qu'un paramètre (l'activité microbienne dans ce cas) n'entraîne une baisse du pH, ou sans la présence d'un support aidant à la nucléation.



Entre les pH 9 et 10, la variation de la solubilité de la silice est très importante. A pH 9, elle est ainsi aux environs de 100 ppm. Ainsi, une baisse minime (de l'ordre de 0,1 pH) suffit à faire baisser significativement cette solubilité et à passer nettement au dessus du seuil de saturation. La légère baisse du pH déjà observée après deux semaines de fossilisation expérimentale (9,5) a donc suffi pour permettre une polymérisation de la silice. Ceci est confirmé par les observations en microscopie électronique, qui ont montré que des nanoparticules de silice (colloïdale ou polymériques) s'étaient formées et étaient présentes sur les cellules et les EPS (Figs. 3-28a et c), soit par polymérisation spontanée dans le milieu, soit aidées par une nucléation sur les groupes fonctionnels des composés organiques du tapis.

Par la suite, la baisse progressive du pH en dessous de 9, a placé le seuil de saturation à une valeur identique à celle des fossilisations expérimentales menées dans les milieux de culture.

En raison du fort pH, il est difficile de dire si la silicification a pu se produire dès le début de la fossilisation expérimentale. En plus de jouer sur la saturation de la silice, ce pH élevé modifie l'ionisation de la silice dissoute (majoritairement sous forme  $\text{HSiO}_3^-$  au dessus de pH 9,5), et peut modifier la charge des différents composants du tapis (EPS, gaine et paroi des filaments). Il est toutefois certain, qu'après deux semaines de fossilisation, les conditions de la polymérisation de la silice, et du début de la silicification étaient réunies.

Pour résumer ce qui s'est passé au début de la fossilisation expérimentale, on peut dire que la silicification a été indirectement initiée par les micro-organismes du tapis microbiens. En faisant baisser le pH du milieu, ils ont par la même favorisé la polymérisation de la silice, et donc leur propre silicification.

### ***Précipitation de la silice sur les structures organiques.***

Avec la baisse progressive du pH, et le milieu qui devient de plus en plus saturé en silice, la silice dissoute va pouvoir polymériser. La silice a pu former spontanément des particules colloïdales et polymériques, dans la solution ou sur les groupes fonctionnels du tapis bactériens.

Des particules de silice étaient déjà présentes dans le tapis à l'état naturel. Ces particules se sont formées dans l'eau d'Octopus Spring. L'eau, contenant environ 150 ppm de silice dissoute, atteint la surface à une température de 93 °C. Du fait du refroidissement et de la baisse de pression, la solubilité de la silice baisse, ce qui entraîne la polymérisation et la formation de particules nanométriques de silice qui se fixent ensuite sur les EPS et les micro-

organismes par liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles du polymère de silice et des molécules organiques (Schultze-Lam *et al.*, 1995 ; Konhauser *et al.*, 2004). La taille de ces particules augmente ensuite progressivement par la poursuite de la polymérisation grâce à l'apport continu de silice par l'eau de la source.

Ces grains naturels se distinguent de ceux qui se sont formés au cours de la fossilisation expérimentale par leur composition. Les analyses EDX y ont montré des traces d'aluminium, présent dans la source à hauteur de 240 ppb (Hinman, communication personnelle), tandis que les particules « artificielles » n'étaient constituées que de silice.

Les particules de silice qui sont apparues au cours de la fossilisation expérimentale étaient présentes aux mêmes endroits que les particules de silice naturelles, ce qui indique que le mécanisme de fixation est identique, et que la silice naturelle n'a pas monopolisé l'ensemble des groupes fonctionnels disponibles.

L'augmentation de la taille des particules de silice naturelle (qui sont passés d'une cinquantaine à une centaine de nanomètres de diamètre après 5 mois de fossilisation, Fig. 3-30b) semble suggérer dans un premier temps une croissance progressive par la fixation continue de la silice « artificielle ». Mais un examen attentif des micrographies MET (Fig. 3-30c) montre que ces grains sont en réalité constitué d'un noyau (certainement le grain de silice originel) autour lequel sont fixés des particules d'une dizaine de nanomètres, et de la même taille que celles fixées sur la gaine des filaments ou les EPS.

En parallèle, pour les particules de silice formées après le début de la fossilisation, c'est davantage leur nombre qui semble avoir augmenté que leur taille.

La fixation de la silice sur la paroi des cellules de *Chloroflexus* n'a été constatée que ponctuellement, au bout de 5 mois de fossilisation. Il y a deux raisons à cette lenteur. Premièrement, comme déjà expliqué précédemment, la gaine fibreuse semble protéger la cellule de la silicification en formant un barrage aux particules de silice. Deuxièmement, *Chloroflexus* est une Bactérie Gram-négative : les groupes fonctionnels susceptibles de fixer la silice sont donc peu nombreux, et la fine couche de peptidoglycane est difficilement accessible car coincée entre les deux membranes plasmiques.

La fine granulation des parois indique que les particules de silice qui se sont fixées sont de très petite taille. Si ces particules se sont formées à l'extérieur de la gaine, leur petite taille a pu leur permettre de passer à travers les mailles de la gaine, pour ensuite se fixer sur la paroi. Il est également possible, et plus probable, que la silice ait franchi la gaine sous forme

monomérique, pour polymériser ensuite en se servant de la paroi comme support pour la nucléation.

#### **4.3.1.8. Bilan**

Ainsi, lors de cette fossilisation expérimentale d'un tapis microbien vivant, la précipitation de silice a été pendant un certain temps limitée aux EPS et à l'extérieur de la gaine fibreuse des filaments de *Chloroflexus*. Cette gaine a fait barrage à la silice et protégé les cellules, qui ont pu survivre pendant ce temps. Toutefois, après plusieurs mois de silicification, la silice a pu franchir cette gaine et commencer à précipiter sur la paroi des cellules.

### **4.3.2. Fossilisation expérimentale d'un tapis microbien moribond**

#### **4.3.2.1. Etat des micro-organismes dans les prélèvements**

La plus grande partie des prélèvements de tapis à *Chloroflexus* au niveau des sites n°1 et 2 était constituée de la partie moribonde du tapis, non exposée à la lumière, et contenant surtout des filaments vides de *Chloroflexus*, et quelques autres espèces de micro-organismes, au sein d'une importante matrice d'EPS. Ainsi il n'y avait essentiellement que les micro-organismes de la couche verte de surface (*Synechococcus* + *Chloroflexus*) qui étaient vivants au moment du prélèvement. Comme expliqué au paragraphe 4.3.1.5., au vu des conditions du milieu lors de la fossilisation, il est très probable que ces micro-organismes aient pu survivre plusieurs mois, avec un métabolisme limité ou dans un état dormant.

Les observations en microscopie électronique, qui ont surtout porté sur la partie moribonde du tapis, ont montré que le déroulement de la fossilisation expérimentale dans le cas présent ne ressemblait en rien à ce qui avait été observé pour le tapis vivant prélevé au site n°3. De plus des observations ponctuelles portant sur la couche de surface ont suggéré que la silicification s'était déroulée de manière totalement différente entre ces deux zones du tapis.

#### **4.3.2.2. Fossilisation naturelle et artificielle des différentes zones du tapis**

En effet, les observations en microscopie électronique et les analyses EDX faites sur les différentes zones du tapis ont montré qu'à l'état naturel, la couche de surface ne contenait pas de silice (Figs. 3-38b et c), tandis qu'elle était présente de manière significative dans les parties moribondes du tapis (Figs. 3-32d et f).

A l'inverse après 5 mois de fossilisation expérimentale, les analyses EDX peinaient à détecter la silice dans ces zones moribondes, pour les deux sites (Figs. 3-35c, f, et g), alors qu'elle était présente dans la couche de surface (Fig. 3-38e).

##### ***Différences à l'état naturel***

Les différences de minéralisation entre les différentes zones du tapis à l'état naturel s'expliquent par l'âge de ces différentes parties. La couche de surface est la zone de croissance du tapis, et est donc récente car en renouvellement constant. Les parties moribondes sont le résultat de la dégradation des micro-organismes et EPS qui étaient auparavant situées en surface, et sont donc présentes dans le tapis depuis plusieurs mois ou plusieurs années (Doemel & Brock, 1977). De ce fait, elles ont été exposées pendant bien plus longtemps à l'eau de la source riche en silice, ce qui a permis une accumulation importante de particules nanométriques de silice sur les EPS et les filaments vides de *Chloroflexus* (Fig. 3-32f). Ces mêmes raisons expliquent que cette minéralisation naturelle soit plus importante que celle observée dans les tapis microbiens prélevés au site n°3.

##### ***Différences au cours de la fossilisation expérimentale.***

En revanche, les différences constatées après 5 mois de fossilisation, ainsi que la silicification tardive de la partie moribonde sont plus difficiles à expliquer.

Au cours de la fossilisation expérimentale du tapis prélevé au site n°1, le pH du milieu n'a pas immédiatement baissé, et est resté autour de pH 10 jusqu'à au moins 5 mois de fossilisation. Les échantillons témoins ont clairement montré qu'à ce pH élevé, il n'y avait pas de précipitation de la silice. Ce n'est qu'avec la baisse du pH qu'une minéralisation importante a été constatée dans la partie moribonde du tapis, après 1 an de fossilisation.

Nous avons vu précédemment que les micro-organismes vivants pouvaient faire baisser le pH du milieu de fossilisation pour le ramener à des valeurs plus proches de leur environnement naturel. Du fait de la méthode de prélèvements (carottage), la couche de

surface prélevée aux sites n°1 et 2 était toutefois bien moins importante que pour le prélèvement effectué au site n°3 (quelques centaines de milligrammes, contre quelques grammes). On peut donc s'attendre à une baisse plus lente du pH, et c'est effectivement ce qui a été observé lors de la fossilisation du tapis prélevé au site n°2.

Les prélèvements effectués de la même manière au site n°1 contenaient une quantité similaire de micro-organismes vivants, mais une quantité bien supérieure de tapis moribond, en raison de l'épaisseur plus importante du tapis à cet endroit. Il faut donc conclure à l'existence d'un mécanisme qui maintiendrait le pH autour de 10, qui pourrait avoir son origine dans la partie moribonde du tapis.

La dégradation des composés de la partie moribonde du tapis pourrait être responsable de la libération de composés basiques. Ce phénomène serait dans un premier temps équilibré avec l'action des micro-organismes vivants, ce qui maintiendrait le pH à 10. La baisse finale du pH pourrait alors s'expliquer par une diminution ou un arrêt de la dégradation, qui permettrait enfin aux micro-organismes de modérer le pH du milieu.

Si les micro-organismes de la couche de surface n'ont pas pu faire baisser le pH de l'ensemble du milieu, il est en revanche possible qu'ils aient pu le faire baisser très localement dans leur entourage immédiat, et rendre ainsi les conditions favorables pour une polymérisation de la silice et une fixation sur les cellules et filaments de cette zone du tapis. Ceci expliquerait la quantité conséquente de silice qui a été détectée sur les spectres EDX (Fig. 3-38e).

Lors de la fossilisation du tapis microbien prélevé au site n°1, les observations en microscopie électronique des parties moribondes du tapis ont montré sans ambiguïté qu'une polymérisation et une fixation de silice s'était produite après deux semaines de fossilisation pour un pH de 9,8 (Figs. 3-34c et d), mais qu'après 5 mois il n'y avait que peu ou pas de traces de silice sur les images (Figs 3-35a 3-36a) ou les spectres EDX (Fig. 3-35c), et que même la silice présente en abondance à l'état naturel semblait avoir disparu (comparer les Figs 3-32f et 3-36a), pour un pH de 10.

Ceci illustre tout d'abord qu'autour du pH 10, le déclenchement de la fossilisation ne tient qu'à très peu de choses, en l'occurrence quelques dixièmes d'unités pH. Ensuite, ces résultats suggèrent que la silicification de la silice a bien été initiée lors des premières semaines de fossilisation, mais que par la suite la silice fixée (naturellement ou artificiellement) s'est redissoute, avant que la silicification soit définitive avec la baisse du pH. Ces fluctuations semblent être la conséquence de légères variations du pH. Mais comme

plusieurs mécanismes peuvent entraîner une hausse du pH (comme la décomposition du tapis, à vérifier) ou une baisse (comme l'activité bactérienne), il est difficile de déterminer les causes de ces fluctuations.

De la même manière, il est difficile d'expliquer pourquoi la partie moribonde du tapis prélevé au niveau du site n°2 n'a pas montré de signes d'une présence de silice après 5 mois de fossilisation. A ce moment, le pH était déjà descendu à 9,1, ce qui entraîne une baisse du seuil de saturation de la silice, et aurait dû permettre la polymérisation et la fixation de cette silice sur les composants organiques, comme cela a été constaté partout ailleurs dès le pH commençait à baisser légèrement.

### **4.3.2.3. Préservation des constituants du tapis**

Si la silicification expérimentale de la partie moribonde du tapis prélevé au site n°1 a tardé à s'enclencher, il faut toutefois constater qu'il y a eu au final préservation d'un certain nombre de constituants de ce tapis.

En raison de l'état de dégradation déjà bien avancé au début de la fossilisation, il est difficile de dire si cette dégradation s'est poursuivie au cours de la fossilisation expérimentale, ou si au contraire, la silicification naturelle ou les premiers soubresauts de la silicification expérimentale ont permis de garantir la préservation, malgré la redissolution ultérieure de la silice. Les micrographies MEB ont cependant permis de montrer qu'un certain nombre de filaments vides de *Chloroflexus* ainsi que la matrice d'EPS ont été préservés au final.

Les mécanismes de fixation des particules nanométriques de silice sur les filaments et les EPS sont les mêmes que ceux impliqués pour la silicification du tapis microbien vivant prélevé au site n°3. La fixation de grains de silice sur les différents composants d'un tapis en état de décomposition déjà bien avancé montre que des groupes fonctionnels susceptibles de fixer la silice (groupes carboxyles ou hydroxyles par exemple) étaient encore présents malgré la dégradation.

### **4.3.2.4. Bilan**

En raison du pH trop élevé en début de fossilisation, il n'a pas été possible, au cours de cette fossilisation expérimentale, de suivre la fixation progressive de silice sur les restes de filaments de *Chloroflexus*, à la manière de ce qui avait été observé pour les tapis prélevés au site n°3, même si la silicification a bien été effective au final. Malgré cela, cette fossilisation



expérimentale a toutefois permis de clarifier certains des mécanismes qui sont intervenus lors de cette étude sur les tapis microbiens prélevés à Octopus Spring, et de montrer que les parties vivantes et mortes n'étaient pas minéralisées de la même manière, que ce soit à l'état naturel qu'au cours de la fossilisation expérimentale.

#### **4.3.3. Comparaison entre fossilisation naturelle et fossilisation artificielle**

##### **4.3.3.1. Comparaison avec la fossilisation in situ de *Chloroflexus* (Strokkur, Islande ; Schultze-Lam et al., 1995)**

Comme cela a déjà été mentionné de nombreuses fois, la fossilisation expérimentale des tapis microbiens prélevés à Octopus Spring présente de nombreuses similitudes avec la fossilisation in situ menée par Schultze-Lam *et al.* (1995) sur des tapis de *Chloroflexus* prélevés au geyser du Strokkur (Islande). Le Tableau 4-III regroupe les principales informations relatives aux deux études.

Les mécanismes de la silicification observés dans les deux cas sont très similaires, avec une précipitation initiale de particules de silice sur la surface extérieure des gaines fibreuses, mais une minéralisation qui semble limitée à cette gaine tant que les cellules restent vivantes.

Toutefois, un degré de silicification aussi avancé que celui observé sur les filaments prélevés au Strokkur n'a jamais été constaté sur les tapis prélevés à Octopus Spring, que ce soit à l'état naturel qu'au terme de la fossilisation expérimentale. Schultze-Lam *et al.* (1995) ont ainsi noté la présence de nombreuses particules de silice sur la paroi des cellules (observée ponctuellement lors de notre étude) et dans le cytoplasme (jamais constatée dans notre cas).

La différence à l'état naturel s'explique par le fait que les eaux émanant du geyser du Strokkur ont une concentration en silice trois fois plus élevée que les eaux d'Octopus Spring (476 ppm contre 140 ppm), ce qui assure une saturation en silice très importante, et permet donc la formation puis la fixation d'un plus grand nombre de particules de silice.

Par la suite, la concentration en silice utilisée pour la fossilisation expérimentale était similaire à celle des eaux du Strokkur, mais il n'y a pas eu d'apport permanent de silice, comme cela se passe dans les conditions naturelles. Si l'on ajoute à cela le pH élevé en début

de fossilisation expérimentale qui a certainement ralenti le début de la précipitation de silice, et la possibilité que la fossilisation des filaments de *Chloroflexus* du Strokkur se soit étalée sur plusieurs années, il est possible d'expliquer le relatif faible taux d'avancement de la silicification expérimentale des tapis prélevés à Octopus Spring.

Ceci montre toutefois qu'il a été possible au cours de l'étude expérimentale, de reproduire de manière satisfaisante le début du processus de la silicification tel qu'il se produit dans les conditions naturelles.

**Tableau 4-III : Paramètres et résultats des fossilisation expérimentales des tapis microbiens prélevés à Octopus Spring et au Strokkur.**

	Paramètres	Tapis d'Octopus Spring (Etat naturel)	Tapis d'Octopus Spring (Après fossilisation expérimentale)	Strokkur, Islande (Schultze-Lam <i>et al.</i> , 1995)
<b>Conditions expérimentales ou naturelles</b>	<i>Température</i>	50-70°C	20-25°C	58°C
	<i>Concentration en silice</i>	~140 ppm	~ 500 ppm (initialement)	476 ppm
	<i>pH</i>	8,0 - 8,4	7,4 - 8,3	8,3 - 9,3
	<i>Apport continu de silice</i>	Oui	Non	Oui
	<i>Fossilisation</i>	<i>In situ</i>	<i>In vitro</i>	<i>In situ</i>
<b>Degré de fossilisation</b>	<i>Gaine fibreuse</i>	Parfois accumulation à l'extérieur	Accumulation	Avancé. Fusion des grains.
	<i>Paroi</i>	Nul	Occasionnellement	Oui
	<i>Cytoplasme</i>	Nul	En progrès	Oui
	<i>EPS</i>	Léger	Avancé	-

#### 4.3.3.2. Comparaison avec le siliceous sinter

De nombreuses études ont déjà porté sur l'observation en microscopie électronique des formations siliceuses des sources chaudes (ou *siliceous sinter*), que ce soit à Yellowstone (Cady & Farmer, 1996) ou ailleurs (par exemple Jones *et al.*, 1998, 2001, 2003, 2004). L'objectif des observations menées sur un *siliceous sinter* prélevé en même temps que les tapis microbiens n'était donc pas de caractériser à nouveau ces formations, mais de recueillir

des informations dans l'optique de repérer des structures analogues à celles observées lors de la fossilisation expérimentale, et ainsi pouvoir faire une comparaison entre la silicification expérimentale et la silicification naturelle.

Ce qui a été observé dans le *siliceous sinter* prélevé en bordure d'une source chaude de Yellowstone correspond à une stade de fossilisation bien plus avancé, sinon final, que ce qui a été observé lors de la fossilisation expérimentale des tapis prélevés à Octopus Spring, ou au geyser du Strokkur (Schultze-Lam *et al.*, 1995). Contrairement à ces derniers cas, où les micro-organismes sont encore dans leur milieu d'origine (eau, température), et présentent encore de nombreux composants cellulaires (gaine fibreuse, paroi, cytoplasme), le *sinter* était hors de l'eau, et donc totalement sec et à température ambiante, et ne montrait en microscopie électronique aucune trace de restes de cellules, hormis leur empreinte dans la silice.

Etant hors de l'eau, on peut considérer que la silicification au sein de ce *sinter* est terminée. On note toutefois la silicification ne s'est pas achevée au même stade pour tous les micro-organismes filamenteux (Fig. 3-39c, d et e), ce qui nous permet de préciser la chronologie de la silicification. Dans un premier temps, la fixation de silice est limitée à l'extérieur et à la paroi, qui est minéralisée (Fig. 3-39c). Par la suite, des sphères de silice se forment à l'intérieur de la cellule, et croissent progressivement avant de fusionner (Fig. 3-39d). Au final, l'intérieur de la cellule est entièrement rempli de silice, et la seule structure cellulaire qu'il soit possible d'identifier est le contour de la paroi (Fig. 3-39e). Cette chronologie est en accord avec celle proposée par Schultze-Lam *et al.* (1995) et cohérente avec les observations faites au cours de la fossilisation expérimentale.

#### **4.3.4. Influence de la technique de préparation sur l'aspect du tapis microbien en microscopie électronique à balayage**

Les tapis à *Chloroflexus* prélevés au site n°3 ont montré des aspects différents suivant qu'ils ont été préparés par dessiccation par la méthode du point critique ou par cryo-préparation.

La cryo-préparation a permis d'observer l'aspect naturel du réseau d'EPS, constitué de feuillets formant des alvéoles (Fig. 3-26e et f). Cette structure alvéolaire a déjà été identifiée par Cryo-MEB dans de nombreuses communautés microbiennes, comme par exemple dans les stromatolites modernes des Kiritimati (Kiribati) ou des Tuamotu (Polynésie Française)

(Défarge *et al.*, 1996 ; et références incluses ; Défarge 1997), ou les lacs hypersalins des Bahamas (Dupraz *et al.*, 2004).

A l'inverse, après la dessiccation par la méthode du point critique, les EPS montraient un aspect filamenteux (Fig. 3-26a). Le séchage a entraîné une contraction des tapis microbiens et l'élimination des EPS en feuillets formant les alvéoles, mais sans conséquences pour la consistance du tapis, et permettant ainsi une meilleure observation des micro-organismes.

Le Cryo-MEB n'a pour l'instant pas été utilisée pour l'observation des tapis microbiens fossilisés expérimentalement. Toutefois, au vu des apports de chaque méthode de préparation et des images des tapis qui ont été obtenues, il convient de réfléchir à l'utilité d'une telle technique pour le suivi de la fossilisation.

Le Cryo-MEB n'est en effet pas l'outil adéquat pour une étude précise du processus de fossilisation. D'une part, cette technique ne permet pas d'obtenir une résolution aussi bonne qu'au MEB classique. Cela complique ainsi d'étudier la fixation des nanoparticules de silice sur structures organiques. Sur le tapis observé, aucune particule de silice « naturelle » n'a pu être observée. Au vu de l'intensité de la minéralisation atteinte au terme de la fossilisation expérimentale (Fig. 3-31b), et de la taille des particules de silice, on peut douter que des micrographies prises au Cryo-MEB puissent les révéler. De plus, en préservant la structure alvéolaire des EPS, cette méthode de préparation masque une grande partie des filaments de *Chloroflexus*, et ne permet donc de suivre leur comportement au cours de la fossilisation. Ainsi, le Cryo-MEB n'est certainement pas l'outil adapté pour l'étude de la fossilisation des micro-organismes présents dans les tapis microbiens et le suivi de précipitation de silice sur les structures organiques.

Toutefois, le Cryo-MEB pourrait être utile pour suivre l'état d'ensemble du tapis tout au long de la fossilisation expérimentale. Puisque les observations faites au MEB ont permis de montrer une très bonne préservation EPS filamenteux (Fig. 3-31b), il serait intéressant de voir s'il y a effectivement une préservation de la structure alvéolaire et de leurs EPS, et de voir si l'aspect général du tapis évolue. Cette méthode de préparation serait ainsi un bon complément au MEB et au MET pour l'étude de la fossilisation expérimentale.

## **4.4. Devenir de la matière organique durant la fossilisation expérimentale de *M. jannaschii***

### **4.4.1. Remarques préliminaires**

Cette étude constitue une première tentative de suivi de la dégradation et de la préservation de la matière organique durant une fossilisation expérimentale. En conséquent, les résultats discutés ci-après souffrent d'un certain nombre d'inconnues et doivent donc être considérés avec de nécessaires réserves. Tout d'abord, les incertitudes expérimentales des diverses méthodes mises en œuvre n'ont pas été déterminées précisément. De ce fait, les quantités de produits mesurées ne doivent être considérées qu'avec prudence, voire méfiance. On peut a priori supposer que l'analyse des acides aminés est assez fiable car reposant sur un protocole quasiment universel (hydrolyse acide de 24 heures à 100°C). En revanche, en ce qui concerne les sucres il a fallu adapter le mode opératoire pour obtenir des résultats, les premières analyses s'étant avérées très décevantes, vraisemblablement en raison d'une interférence de la silice. En ce qui concerne les acides gras, l'emploi de standards internes doit garantir une certaine fiabilité des résultats. Cependant, les résultats des deux approches supposées attaquer des acides gras initialement engagés dans des combinaisons chimiques différentes (esters et amides, respectivement hydrolysables et saponifiables) peuvent se recouvrir partiellement ou même totalement en ce qui concerne d'éventuels acides gras initialement libres ou libérés en cours de fossilisation. En fait, cette dernière remarque revêt un caractère général car il n'a pas non plus été vérifié qu'il n'y avait ni acides aminés, ni monosaccharides libres dans la culture initiale, ni non plus aucune libération de tels composés monomériques par hydrolyse de polysaccharides et/ou des protéines, tout au long des expériences de fossilisation.

En raison de ces diverses inconnues et incertitudes, la discussion suivante est limitée aux traits majeurs de l'évolution des quantités des diverses familles de composés analysés, durant la fossilisation, ainsi qu'à leurs distributions.

#### **4.4.2. Préservation finale de la matière organique**

##### **4.4.2.1. Comparaison des compositions initiales et finales**

**Tableau 4-IV : Masses totales des différentes catégories de molécules organiques analysées (exprimées en µg par g de lyophilisat) dans la culture d'origine et au terme de la fossilisation expérimentale.**

	<i>Etat naturel</i>	<i>1 an de fossilisation</i>	<i>Différence</i>
<i>Acides aminés</i>	640	1068	+ 66 %
<i>Monosaccharides</i>	161	53	- 67 %
<i>Acides Gras (TMAH)</i>	18,9	66,5	+ 252 %
<i>Acides Gras (Hydrolyse acide)</i>	88,9	108,4	+ 22 %

Comme cela a déjà été mentionné (cf. paragraphe 3.6.2.2.), la composition en acides aminés mesurée au terme de la fossilisation expérimentale est pratiquement identique à celle de la culture d'origine (Fig. 3-47). C'est ainsi un pool d'acides aminés très semblable à celui présent à l'origine qui a finalement été préservé.

Il y a donc eu une préservation uniforme de l'ensemble des acides aminés quels qu'ils soient et quelque soit le type de structure organique (EPS ou cellules) dans lesquels ils se trouvaient initialement. En effet, les acides aminés identifiés en plus grande quantité dans les EPS (Val, Leu, Ile, Pro, Phe) ou dans les cellules (Asp, Glu) n'ont pas été mieux ou moins bien préservés les uns que les autres.

Si les acides aminés présents à l'origine dans les cultures semblent avoir été bien préservés, ce n'est pas le cas des autres catégories de molécules organiques. Ainsi les monosaccharides ont été fortement dégradés au cours de la fossilisation. Seulement un tiers de la quantité originelle (Tableau 4-IV) a été préservée au terme de l'expérimentation, et uniquement du glucose.

Il est plus difficile d'établir un bilan pour les acides gras, en raison des deux méthodes d'extraction utilisées et du possible recouvrement des résultats (cf. paragraphe 4.4.1.). A l'instar des acides aminés, les acides gras extraits par hydrolyse acide semblent s'être préservés tant en quantité (Tableau 4-IV) qu'en composition durant la fossilisation (Fig. 3-59). Ce n'est pas le cas pour les acides gras extraits par thermochimiolysse au TMAH (Fig. 3-58).

Ainsi, si l'on compare uniquement les quantités initiales et finales, il apparaît donc que ce sont les acides aminés qui ont été les mieux préservés au cours de la fossilisation



expérimentale. A l'inverse, les monosaccharides ont été particulièrement affectés par la dégradation, les acides gras se situant en position intermédiaire.

#### **4.4.2.2. Etat final de la matière organique**

Les observations en microscopie électronique avaient suggéré que seuls les EPS avaient été préservés au terme de la fossilisation expérimentale. Dans cette hypothèse, l'analyse séparée des EPS et des cellules d'une culture non fossilisée devait permettre d'identifier les composés spécifiques à ces deux catégories de produits, pour ensuite suivre leurs comportements au cours de la fossilisation expérimentale, et enfin valider ou infirmer les conclusions tirées des observations en microscopie électronique.

Des différences de composition entre EPS et cellules ont surtout été constatées pour les acides aminés (Figs. 3-41 et 3-42), alors que des compositions assez similaires ont été constatées pour les acides gras extraits par thermochimiolysse au TMAH (Fig. 3-53).

Bien que les observations en microscopie électronique aient suggéré que seuls des EPS étaient encore présents au terme de la fossilisation, les analyses de la matière organique montrent que les acides aminés davantage présents dans les EPS à l'origine ne sont pas mieux préservés que les autres au final.

Ainsi le constat fait à partir des observations en microscopie électronique d'une lyse des cellules, et d'une seule préservation EPS est très certainement simpliste. La matière organique préservée en fin de fossilisation n'est sans doute pas uniquement constituée d'EPS, mais également des restes cellulaires dont le matériel biochimique s'est également préservé. Il est également possible que cette matière organique préservée soit plutôt informe, et composée de restes des structures organiques dégradées.

L'analyse séparée des EPS et des cellules n'a pas permis, comme cela était espéré initialement, de suivre le comportement des cellules et des EPS au cours de la fossilisation. Elle a toutefois été utile, en permettant, non pas de confirmer les conclusions de la microscopie électronique, mais de montrer que la situation n'était pas aussi simple qu'estimée.

#### 4.4.3. Evolution de la matière organique tout au long de la fossilisation

La similitude des compositions en acides aminés au début et au terme de la fossilisation expérimentale est d'autant plus surprenante qu'un certain nombre de processus « diagénétiques » ont pu être identifiés tout au long de la fossilisation expérimentale. La microscopie électronique a ainsi montré une lyse rapide de l'ensemble des cellules. Les micro-organismes semblent aussi avoir réagi au stress de l'injection de la silice par une production importante d'EPS. Les analyses de la matière organique nous permettent d'éclaircir ces phénomènes.

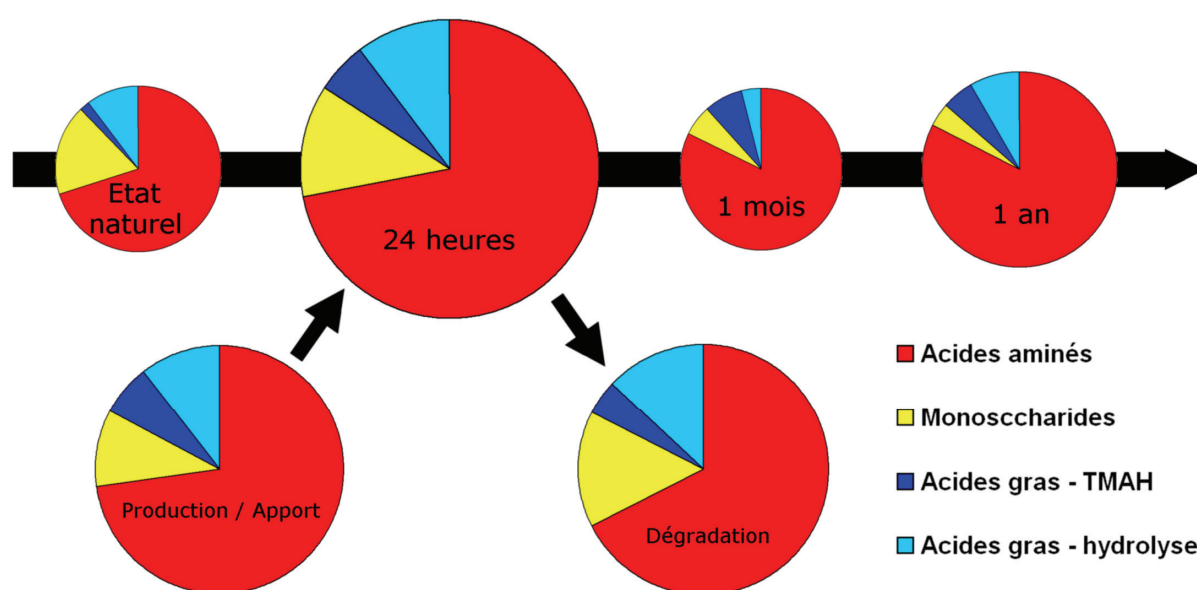


Fig. 4-9 : Evolution des proportions relatives des différents types de molécules organiques analysées au cours de la fossilisation expérimentales. Les aires sont proportionnelles aux masses analysées.

##### 4.4.3.1. Apport de matière organique pendant les premières 24 heures de fossilisation

Avant d'aborder l'étude des constituants organiques il convient de rappeler quelques faits d'observation majeurs qu'il est indispensable de garder présents à l'esprit durant la discussion des résultats d'analyses biochimiques. L'influence de l'ajout de la silice sur la culture de *M. jannaschii* a été très nette, très rapide, et constatée après seulement 24 heures après le début de la fossilisation. Un important de précipité de silice s'est formé en quelques heures. Les observations au MEB montraient une grande quantité d'EPS piégée à l'intérieur de ce précipité. Par ailleurs, les micrographies au MET montraient que les cellules vivantes

piégées à l'intérieur du précipité de silice semblaient avoir mis en place un mécanisme de protection actif, permettant de repousser la silice et d'éviter qu'elle ne précipite au contact de leur paroi.

Pendant ces premières 24 heures, les analyses des différents types de molécules organiques ont toutes montré une forte augmentation de leur teneur dans le milieu (Fig. 4-9), leurs masses totales ayant augmenté de deux à près de cinq fois par rapport à leurs valeurs d'origine (Tableau 4-V).

**Tableau 4-V : Augmentation des quantités des différentes molécules organiques analysées pendant les 24 premières heures de fossilisation.**

Familles de molécules organiques	Augmentation des masses totales lors des 24 premières heures de fossilisation
<i>Acides aminés</i>	+ 233 %
<i>Monosaccharides</i>	+ 123 %
<i>Acides gras (TMAH)</i>	+ 471 %
<i>Acides gras (Hydrolyse acide)</i>	+ 119 %

Dans la partie Résultats, nous avons évoqué à plusieurs reprises des augmentations subites des masses totales de composés organiques. C'est le cas en ce qui concerne les échantillons fossilisés pendant 24 heures, mais aussi au bout de 2 mois où l'on observe, pour tous les composés organiques analysés, des augmentations de masses totales, toutefois d'intensités diverses selon les composés.

Si les observations en microscopie électronique montrent effectivement des bouleversements susceptibles d'expliquer les augmentations des masses pendant les premières 24 heures, il n'en va pas de même pour le pic à 2 mois. Aucun changement conséquent n'a en effet été noté au MEB entre les échantillons fossilisés pendant 1 et 2 mois. De plus, plus aucune cellule n'était observée en microscopie électronique au delà d'une semaine de fossilisation. Les pourcentages des différents acides aminés ne laissent non plus transparaître aucune évolution importante entre 1 mois et 2 mois de fossilisation (Fig. 3-45), ce qui suggère qu'aucun phénomène d'importance lié à la fossilisation ne s'est produit entre ces deux moments. Les fortes valeurs de masses totales observées à 2 mois s'expliquent donc plus probablement par un artefact expérimental, comme par exemple une hétérogénéité de l'échantillon (le lyophilisat prélevé pour l'analyse serait particulièrement riche en matière organique, et donc en acides aminés), ou tout simplement par une erreur de pesée. Ceci reste donc à vérifier.

En revanche, plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'augmentation soudaine des masses constatée après 24 heures de fossilisation :

Tout d'abord un problème lié au mode opératoire :

- Une erreur de pesée, avec une sous-estimation de la masse de lyophilisat utilisée pour l'analyse. Cependant, le fait que l'on retrouve cette augmentation sur trois analyses distinctes (acides aminés, monosaccharides et acides gras) permet d'exclure cette éventualité.
- Des variations de la quantité de milieu conservé pour la lyophilisation (cf. partie Résultats, paragraphe 3.6.1). Toutefois, dans le cas présent, les écarts par rapport à l'origine sont trop importants pour être seulement expliqués de cette manière.

Un artefact n'est donc certainement pas à mettre en cause pour expliquer cette augmentation ; celle-ci semble donc bien due à un phénomène lié à la fossilisation et aux micro-organismes. Ainsi, on peut envisager :

- une importante production d'EPS par les cellules suite à l'injection de la silice dans le milieu de culture. Ceci concorde avec les observations en microscopie électronique.
- une précipitation d'EPS déjà présents en solution dans le milieu avant l'injection de silice, qui se seraient alors retrouvés concentrés dans le précipité et donc dans le lyophilisat, ce qui n'était pas le cas pour l'échantillon « *Etat naturel* ». Cette hypothèse est également en accord avec les observations faites au MEB.
- Une poursuite de la croissance des cellules après l'injection de la silice. Toutefois, la silicification expérimentale a été entamée à la fin de la phase exponentielle de croissance, soit à un moment, où le nombre de cellules n'augmente normalement plus. De plus, après l'augmentation du pH consécutive à l'injection de la silice, les conditions du milieu ne permettaient pas la croissance des cellules de *M. jannaschii*.

Après examen de ces diverses hypothèses, la plus probable pour expliquer l'augmentation de la quantité de matière organique paraît être les EPS produits par les cellules de *M. jannaschii*. Ici encore, il y a différentes possibilités pour expliquer l'origine de ces EPS.

Il est ainsi possible que ces EPS aient été présents dans le milieu de culture avant l'injection de la solution de silice, mais qu'ils se soient au final retrouvés dans le lyophilisat, à la faveur de la précipitation et de la polymérisation de la silice.

En effet, les EPS dissous dans le milieu de culture en ont principalement été extraits en les faisant précipiter grâce à de l'éthanol absolu. Et seule une partie du milieu originel a été conservée dans les lyophilisats. Cette remarque vaut notamment pour la préparation du lyophilisat de l'échantillon « *Etat naturel* » au cours de laquelle une grande partie des EPS dissous a été éliminée. Ceci a également pu se produire pour les échantillons en cours de fossilisation, à moins que la silice, en précipitant, n'ait également entraîné la précipitation de tout ou partie de ces EPS.

La polymérisation de la silice et la formation d'un précipité blanchâtre, consécutives à l'injection de la silice, ont été légèrement plus rapides dans les flacons avec micro-organismes que dans ceux qui en étaient dépourvus. Les EPS dissous ont pu favoriser la polymérisation de la silice, en fournissant un support passif, et auraient été entraînés avec la silice dans le précipité blanchâtre qui est rapidement apparu. Ce schéma permettrait ainsi d'expliquer le mélange EPS / silice déjà bien formé après seulement 24 heures de fossilisation (Fig. 3-8a).

La majeure partie des EPS qui ont été extraits des cultures provenait de ce surnageant qui n'a pas été conservé dans le lyophilisat. Dans le cas où la précipitation de la silice aurait entraîné ces EPS avec elle, on devrait noter, après 24 heures de fossilisation une évolution de la composition en acides aminés qui va dans le sens de la composition spécifique des EPS. Si l'on note effectivement un appauvrissement en acides aminés dicarboxyliques (Asp, Glu), il n'y a rien à signaler du côté des acides aminés qui étaient davantage présents dans les EPS (Val, Leu, Ile, Pro, Phe), et qui restent stables au terme de ces premières 24 heures de fossilisation (Fig. 3-44).

En injectant de la silice dans le surnageant récupéré après centrifugation d'une culture de *M. jannaschii*, il serait possible de vérifier si la silice peut effectivement entraîner, en polymérisant, une précipitation des EPS dissous, en observant le précipité formé et en analysant sa composition en matière organique.

Les EPS peuvent aussi avoir été produits par les micro-organismes en réaction à l'injection de la silice. Les observations effectuées en microscopie électronique lors de la fossilisation expérimentale d'autres micro-organismes semblent aller dans ce sens.

Si la silice avait effectivement entraîné une précipitation, même partielle, des EPS en solution, ils auraient alors vraisemblablement été observés de manière systématique, lors de la

fossilisation expérimentale de tous les micro-organismes. Or, dans le cas de *P. abyssi* (la souche la plus proche de *M. jannaschii* utilisée lors de cette étude) aucun EPS n'a été détecté visuellement (Fig. 3-1b et c).

Parmi les autres souches, la présence significative d'EPS après le début de la fossilisation n'a été constatée que lors de la fossilisation de *Rhodovulum sp.* à 60°C, en conséquence d'un stress thermique.

En revanche, lors de ces différentes fossilisations expérimentales, nous avons pu voir que les micro-organismes pouvaient se défendre activement contre la présence de silice et le stress osmotique qu'elle entraîne. La production d'EPS a été évoquée pour *M. jannaschii* (LaPaglia & Hartzell, 1997 ; Johnson *et al.*, 2005), mais aussi lors de la fossilisation expérimentale de *S. azorensis* (Lalonde *et al.*, 2005).

Ainsi, les observations en microscopie électronique fournissent des éléments qui appuient les deux hypothèses et ne permettent donc pas de trancher. Par conséquent, il faut considérer la possibilité que la grande quantité d'EPS présents après 24 heures de fossilisation soit le résultat de ces deux phénomènes, une précipitation des EPS par la silice, et une production par les cellules en réaction à la présence de silice.

Il convient aussi d'ajouter qu'il est fort probable que la quantité maximum de matière organique réellement présente dans les milieux n'a pas été atteinte exactement au bout de 24 heures, mais ne peut être datée précisément faute d'échantillonnage à plus court pas de temps. Si la formation du précipité de silice a été effective en quelques heures, la production d'EPS par les cellules, en réaction à la présence d'une forte concentration de silice, s'est certainement poursuivie durant la première semaine de fossilisation, jusqu'à la lyse des dernières cellules. Toutefois l'intensité de cette production a certainement baissé avec la diminution du nombre de cellules.

A l'inverse, la dégradation de la matière organique, déjà ressentie entre 24 heures et 1 semaine de fossilisation et qui sera évoquée au paragraphe suivant, devait déjà être effective pendant les premières 24 heures de fossilisation. Tant que les cellules étaient en nombre suffisant pour produire une quantité d'EPS susceptible de compenser la dégradation, la quantité de matière organique présente dans le milieu se maintenait, voire augmentait.

Ainsi, la quantité maximale de matière organique dans les milieux a probablement dû être atteinte après quelques jours de fossilisation, probablement vers le milieu de la première semaine. Inversement, la baisse de la quantité de matière organique constatée après une

semaine de fossilisation n'a sans doute pas été immédiate, et il a également fallu quelque jours de baisse successifs pour atteindre ce bas niveau.

#### 4.4.3.2. Dégradation immédiate des EPS et stabilisation

Des cellules de *M. jannaschii*, mêlées au précipité de silice, ont été observées tout au long de la première semaine de fossilisation. Toutefois, les seules cellules visibles étaient peu nombreuses et lysées (Fig. 3-9a). Sur les échantillons fossilisés plus longtemps (deux semaines et au delà), aucune cellule n'a été repérée.

Dans le même temps, les quantités des différents types de molécules organiques analysées ont toutes fortement baissé (Fig. 4-9). Suivant les composés, cette baisse a été effective après 1 semaine ou 1 mois de fossilisation.

Le tableau 4-VI ci-après compile les évolutions des masses totales de composés organiques analysés lors du premier mois de la fossilisation. Il complète le tableau 4-V qui montrait les écarts constatés lors des premières 24 heures de fossilisation.

**Tableau 4-VI : Baisse des quantités des différentes molécules organiques analysées entre 24 heures de fossilisation jusqu'à 1 semaine et 1 mois.**

	Evolution entre l'Etat naturel et		Evolution entre 24 heures et	
	1 semaine	1 mois	1 semaine	1 mois
<i>Acides aminés</i>	+ 76 %	+ 9 %	- 47 %	- 67 %
<i>Monosaccharides</i>	n.d	- 66 %	n.d.	- 85 %
<i>Acides Gras (TMAH)</i>	+ 325 %	+ 259 %	- 49 %	- 57 %
<i>Acides Gras (Hydrolyse acide)</i>	- 75 %	- 65 %	- 92 %	- 89 %

Ainsi après un mois de fossilisation expérimentale, c'est une part importante des molécules organiques présentes après 24 heures de fossilisation qui a disparu (les deux tiers des acides aminés, 85 % des monosaccharides et plus de la moitié des acides gras), revenant dans l'ensemble à un niveau très proche de celui de la culture originelle.

Cette baisse se traduit différemment suivant les types de composés. Ainsi seule la moitié des acides aminés présents après 24 heures a disparu après 1 semaine, avec une baisse qui se poursuit encore après un mois. Pour les acides gras analysés après thermochimie au



TMAH, la baisse est de même ampleur après une semaine, mais les masses totales se stabilisent par la suite, et ne bougent pratiquement plus jusqu'au terme de la fossilisation. Enfin, c'est pour les monosaccharides que la baisse entre 24 heures et 1 mois est la plus spectaculaire.

Si l'on regarde les évolutions individuelles des pourcentages des différentes molécules, on voit que bien souvent l'évolution suivie entre 24 heures et une semaine (ou 1 mois) de fossilisation est contraire à celle notée durant les premières 24 heures de fossilisation.

D'un côté, certaines molécules ont vu leurs proportions augmenter durant les premières 24 heures (ce qui a été interprété comme un apport d'EPS enrichis en ces composés). C'est le cas pour la lysine et l'histidine pour les acides aminés (Fig. 3-45b), le glucose pour les monosaccharides (Fig. 3-50), les  $n\text{-C}_{16:0}$  et  $n\text{-C}_{18:0}$  pour les acides gras extraits avec le TMAH (Fig. 3-56). A l'exception du  $n\text{-C}_{16:0}$ , tous ces composés ont vu leurs proportions diminuer à la fin de la première semaine de fossilisation (Figs. 3-45b, 3-50 et 3-56).

Inversement, les proportions de plusieurs composés (moins présents dans les EPS néoformés) baissent pendant les premières 24 heures. Il en est ainsi des acides aspartique et glutamique ainsi que de la glycine en ce qui concerne les acides aminés (Fig. 3-45a), du mannose pour les monosaccharides (Fig. 3-50). Ici également, les pourcentages de la plupart de ces composés ont augmenté après une semaine ou 1 mois de fossilisation (Fig. 3-45a et 3-50).

Ceci suggère qu'une partie des EPS apparus à l'analyse pendant les premières 24 heures (produits par les cellules ou précipités par la silice) ont été très vite dégradés, et que la silice a été plutôt inefficace pour les préserver.

En parallèle à cela, la similitude des compositions en acides aminés déterminées en début et fin de fossilisation expérimentale (cf. paragraphe 4.4.2.1.) laisse entendre que les cellules et EPS présents dans le milieu au moment de l'injection de la silice n'ont que peu, voire pas été affectés par cette dégradation. Par conséquent, ce n'est pas au niveau d'une lyse progressive des cellules qu'il faut chercher l'origine de la baisse des composés considérés.

La microscopie électronique a montré des EPS au sein du précipité de silice tout au long de la silicification, ce qui montre qu'ils ont été au moins en partie préservés. Comme cela a été précédemment expliqué, il est probable que ces EPS aient été présents, dissous dans

le milieu de culture, avant l'injection de la silice, et ont précipité après la fixation de la silice, à laquelle ils fournissaient un site de nucléation. Leur préservation indique que la baisse des masses totales entre 24 heures et 1 mois de fossilisation serait plutôt due à la dégradation des EPS produits par la cellule en réaction à l'ajout de silice.

Après la polymérisation initiale et la formation du précipité blanchâtre, de la silice dissoute était encore présente dans le milieu à une concentration légèrement supérieure au seuil de saturation, ou sous forme de particules nanométriques de silice colloïdale (cf. paragraphe 4.1.4.1.). Cette silice était donc toujours disponible pour la silicification tout au long de la fossilisation expérimentale. Par conséquent, la dégradation des EPS produits par les cellules après l'injection de la silice est plus probablement due à leur fragilité. De ce fait les molécules de base de ces EPS ont dû, au cours de la dégradation être libérées dans le milieu, devenant par là même absents du lyophilisat, et donc des résultats des analyses (pour la raison inverse de celle évoquée pour l'apparition des EPS présents à l'origine dans le milieu et précipités par la silice ; cf. paragraphe 4.3.1.1.).

Au delà d'un mois de fossilisation et jusqu'au terme de l'étude, aucun changement notable n'a été constaté par microscopie électronique : plus aucune cellule, intacte ou lysée, de *M. jannaschii* n'a été observée. Le précipité de silice, progressivement de plus en plus dense, était mélangé à des EPS, révélés soit visuellement, soit par les analyses EDX.

A partir du moment où toutes les cellules avaient lysé, il ne pouvait plus y avoir de production de matière organique dans le milieu. Les évolutions constatées à partir de ce moment clef ne sont donc imputables qu'à la transformation et/ou à la dégradation de la matière organique présente, sans nouvel apport.

Avec la fin de la dégradation des EPS, les masses totales analysées semblent s'être peu ou prou stabilisées à partir d'un mois de fossilisation ; les proportions des différents types de molécules organiques ne varient presque plus entre 1 mois et 1 an de fossilisation (Fig. 4-9). Quelques évolutions individuelles de certaines molécules organiques ont été notées jusqu'au terme de la fossilisation expérimentale, comme par exemple celles de la lysine ou de la proline (Fig. 3-45b et d). Elles peuvent être dues soit à des artéfacts, soit être les derniers signes de la dégradation des EPS.

#### 4.4.3.3. Bilan des hypothèses

Pour résumer, et en exagérant volontairement les choses, on pourrait affirmer que la production des EPS et leur dégradation qui se sont respectivement produites au début et durant le premier mois de la fossilisation expérimentale n'ont eu aucune conséquence sur la composition finale en matière organique au terme de la fossilisation expérimentale. Ces phénomènes empêchent toutefois de parfaitement estimer la fraction de la matière organique présente à l'origine qui a été préservée au final.

En suivant ces raisonnements, les EPS qui ont été vus en microscopie électronique au sein du précipité de silice au cours de la fossilisation expérimentale, et qui ont été finalement préservés sont donc les EPS dissous dans le milieu de culture, et non ceux qui ont été produits par les micro-organismes en réaction à la présence de silice.

La Fig. 4-10 fait une synthèse simplifiée des hypothèses proposées pour expliquer les évolutions des masses analysées au cours de la fossilisation expérimentale de *M. jannaschii*, avec une augmentation des masses analysées dues à la précipitation d'EPS contenus dans le milieu, et la production d'EPS en réaction à l'injection de la silice. La baisse des masses qui suit est due à la dégradation de ces EPS néo-synthétisés. Au final, seuls les composés qui étaient présents dans le milieu avant l'injection de la silice sont préservés.

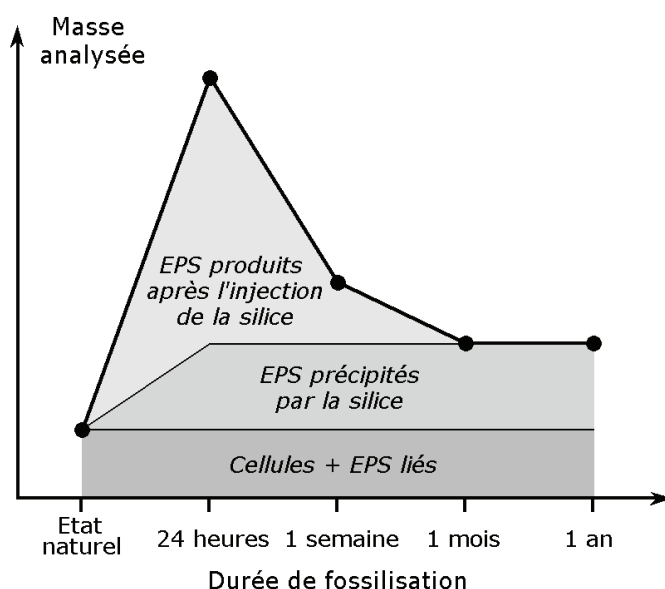


Fig. 4-10 : Synthèse des différentes hypothèses émises pour expliquer les variations des masses des composés organiques analysés.

#### **4.4.3.4. Origine de la matière organique présente dans le surnageant**

Le surnageant du flacon de culture fossilisé pendant 1 an contenait encore des teneurs significatives de matière organique : environ un tiers de la teneur du précipité en acides aminés, et un dixième des acides gras extraits par thermochimie au TMAH.

Certains éléments suggèrent que cette matière organique était présente dans le surnageant dès l'origine, sous forme d'EPS dissous. En effet la composition en acides aminés du surnageant montre des similitudes avec celle des EPS extraits de la culture, notamment avec des teneurs relativement élevées en acides aminés neutres (Gly, Ala, Val), et faibles en acides aminés dicarboxyliques (Asp, Glu) par rapport à la composition du précipité de silice (Fig. 3-47). Les mêmes tendances ont été notées pour les EPS, par rapport aux cellules (Fig. 3-42). Si cette matière organique provient d'EPS présents depuis longtemps dans le surnageant, alors les relativement faibles quantités détectées montrent qu'il n'en reste plus grand chose après un an de fossilisation, et qu'il n'y donc pas eu de préservation. Mais cela signifie également que la silice, en précipitant, n'a pas entraîné avec elle toute la matière organique dissoute dans le milieu.

Une autre hypothèse pour expliquer la provenance de cette matière organique est qu'elle serait issue de la décomposition des composés emprisonnés dans le précipité de silice, et qui auraient été relargués dans le milieu, notamment après la dégradation des EPS évoquée précédemment. Au vu de nos données expérimentales, il n'est pas possible de vérifier cette dernière hypothèse. On peut toutefois dire que les composés (acides aminés ou acides gras) qui sont le plus affectés par la dégradation entre 24 heures et 1 mois de fossilisation (la lysine par exemple, Fig. 3-45b), ne sont pas davantage présents dans le surnageant.

#### **4.4.4. Bilan de la préservation de la matière organique et rôle de la silice**

Au delà des comportements propres à chaque famille de composés, il semble y avoir eu une préservation non spécifique des molécules organiques. Le fait que le précipité de silice présent au fond des flacons après an de fossilisation ait une composition en acides aminés presque identique à celle de la culture d'origine suggère un rôle de la silice dans la préservation à terme de ces composés.

La préservation de la matière organique s'est toutefois faite sans aucun lien avec une affinité (ou non affinité) supposée des molécules avec la silice. La préservation n'a donc pas été déterminée à l'échelle de la molécule, mais plutôt à l'échelle de la macromolécule (peptide, protéine par exemple), ou de la structure organique (restes de membranes, de S-Layer, EPS).

Les flacons de culture où la fossilisation expérimentale a été effectuée sont restés scellés et sous anaérobiose pendant toute la durée de la fossilisation. Il n'y a donc pas eu de contamination extérieure. Après la lyse des dernières cellules de *M. jannaschii* (aux environs d'une semaine de fossilisation), on peut considérer que ces flacons étaient stériles. Dans ces conditions, et indépendamment de la présence de silice, la dégradation des molécules organiques n'a pas dû, voire pu être très importante. Les constituants des EPS produits par les cellules en réaction à l'injection de la silice et dégradés rapidement ensuite sont certainement encore présents dans les milieux, mais n'apparaissent pas sur les analyses, car ils ont été libérés du précipité après la dégradation et sont donc au final absents du lyophilisat. De la silice était encore disponible sous forme dissoute et colloïdale ; la non-préservation de ces EPS n'est donc pas le fait de la silice, mais plutôt de leur fragilité.

Ainsi, ce n'est donc pas la silice qui est directement responsable de la préservation des molécules organiques trouvées dans le précipité de silice au terme de la fossilisation expérimentale. Même sans la présence de silice, la matière organique que l'on retrouve au final dans le précipité aurait probablement été préservée.

Toutefois, en servant de site pour la nucléation de la silice, les cellules et EPS présents à ce moment là se sont retrouvées liés au précipité qui s'est formé en quelques heures, et l'ont suivi quand celui-ci a décanté au fond des flacons. Avec le temps, ce précipité est devenu de plus en plus compact. D'aspect floconneux et lâche après sa formation, il a peu à peu décanté et finalement s'est compacté pour former un précipité cohérent et solidement fixé au fond des flacons. Il a ainsi permis un piégeage des molécules organiques pouvant faciliter leur préservation à long terme. Ce piégeage permet en effet d'éviter leur dégradation par des facteurs extérieurs, et laisse ainsi le temps à la silice de précipiter sur ce qu'il reste des EPS et des cellules et de les préserver.

## 4.5. Implications pour l'exobiologie

L'objectif de cette étude était de fossiliser des micro-organismes extrêmophiles tout en simulant les conditions supposées de la Terre primitive. Les résultats des fossilisations expérimentales de *P. abyssi* et *Geobacillus sp.* ont montré que cela était possible, dans des conditions similaires à celles des environnements hydrothermaux passés ou actuels (température, concentration en silice, absence d'oxygène).

Lors de cette étude, la première tentative de fossilisation expérimentale de souches d'Archées a été menée. *P. abyssi* a montré que les Archées pouvaient effectivement être fossilisées, avec des mécanismes et une intensité similaires à ceux observés lors des précédentes études sur des Bactéries Gram-négatives (Birnbaum *et al.*, 1989 ; Westall, 1997, Toporski *et al.*, 2002). Par conséquent, la possibilité que les microfossiles retrouvés dans les roches anciennes aient pu être des Archées peut être envisagée.

L'identification formelle de microfossiles d'Archées ne pourra toutefois pas se faire sur des critères morphologiques. Après 1 an de fossilisation, lors de l'expérimentation avec *P. abyssi*, il était impossible de dire sur la seule base des observations en microscopie électronique qu'il s'agissait d'une Archée, en raison de la précipitation importante de silice sur la paroi qui masquait sa structure (S-Layer et membrane plasmique, Fig. 4-5). Toutefois les lipides membranaires particuliers des Archées peuvent laisser des signatures moléculaires particulières et permettre malgré tout leur identification. Les résultats des analyses des lipides membranaires au cours de la fossilisation expérimentale de *M. jannaschii* devraient permettre de préciser leur comportement pendant les premiers temps de la fossilisation.

L'absence de fossilisation des cellules de *M. jannaschii*, et ce quelque soit le mode opératoire utilisé, montre que tous les micro-organismes ne peuvent pas être fossilisés. Cela implique que les microfossiles que l'on trouve dans les roches datant de l'Archéen inférieur jusqu'à la période actuelle ne sont pas représentatifs de l'ensemble de la communauté microbienne présente à l'origine.

Il est évidemment impossible de recréer expérimentalement la fossilisation complète des micro-organismes et l'ensemble de l'histoire géologique des microfossiles, qui s'étale sur

plusieurs milliards d'années. Cette étude s'est donc concentrée sur les premières étapes du processus de fossilisation, et a permis de souligner l'importance critique de cette période. Les cellules de *M. jannaschii* et de *Rhodovulum sp.* (lors de la fossilisation à 60°C) ont en effet lysé très rapidement dès le début de la fossilisation expérimentale, et n'ont finalement pas été préservées.

Avec une lyse se produisant durant les premières semaines de la silicification, il ne faut pas espérer que les restes cellulaires soient bien préservés, et que l'on puisse finalement retrouver une signature morphologique de ces micro-organismes dans les roches. Toutefois, les analyses chimiques ont suggéré que la matière organique issue des cellules de *M. jannaschii* était encore présente au terme de la fossilisation expérimentale. Il est donc possible, que malgré la lyse des cellules, il en subsiste des traces sous la forme de signatures moléculaires.

Après les processus de la fossilisation, qui ont fait l'objet de cette étude, plusieurs facteurs peuvent entraîner l'altération ou la destruction des microfossiles durant les étapes successives de la sédimentation, de la diagenèse, du métamorphisme, voire de l'érosion. Toutefois, le fait que des microfossiles vieux de 3,47 Ga aient été trouvés dans les enregistrements fossiles montre que, si la silicification a affecté ces micro-organismes, elle a été suffisamment efficace pour préserver leur morphologie et une part de leur matière organique jusqu'à aujourd'hui. Un échec de la fossilisation s'explique donc davantage par une absence de préservation des micro-organismes dans la courte période suivant leur mort, que par l'histoire géologique ultérieure des roches contenant les microfossiles.

A l'inverse, à l'exception de *Geobacillus sp.*, les cellules qui ont été silicifiées et bien préservées (*P. abyssi*, *Rhodovulum sp.*) sont celles qui ont pu survivre un certain temps dans un milieu saturé en silice. Par comparaison avec la fragilité des cellules de *M. jannaschii*, on peut qualifier ces cellules de robustes. Ainsi, parmi la communauté microbienne présente à l'Archéen, les microfossiles correspondraient à la fraction la plus résistante et la plus tolérante aux fortes concentrations en silice et aux changements subits de conditions environnementales. Toutefois cette remarque ne peut s'appliquer qu'aux Archées et aux Bactéries Gram-négatives dont la silicification demande un certain temps du fait de la faible disponibilité des groupes fonctionnels capables de fixer la silice (cf. paragraphe 4.1.3.1. et Westall, 1997). Il faut en effet nuancer ces remarques pour les Bactéries Gram-positives. Malgré des cellules de *Geobacillus sp.* déjà mortes ou moribondes au début de la fossilisation, la fixation de silice a été rapide et a permis une bonne préservation des cellules, sans



qu'aucune accentuation de leur dégradation n'ait finalement été constatée. Cela confirme la bonne capacité des Bactéries Gram-positives à être fossilisées, comme l'avait précédemment montré Westall (1997).

Nous avons donc eu au cours de cette étude, d'un côté un certain nombre de Bactéries Gram-négatives ou d'Archées qui n'ont été fossilisées que lorsqu'elles furent capables de tolérer les conditions de la fossilisation, et de l'autre côté une Bactérie Gram-positive qui a été fossilisée malgré une dégradation déjà avancée au début de fossilisation.

Les Bactéries Gram-positives semblent donc beaucoup moins sensibles que les autres types de Procaryotes aux aléas qui peuvent survenir au tout de début de la fossilisation. Par conséquent, les Bactéries Gram-positives ont certainement beaucoup plus de chances que les Bactéries Gram-négatives ou les Archées d'être préservées et d'être finalement présentes dans les roches anciennes.

Toutefois, cela ne signifie pas pour autant que tous les microfossiles proviennent de Bactéries Gram-positives, notamment pour l'Archéen inférieur. Les études menées sur les roches de cette époque ont en effet permis de montrer que les microfossiles identifiés pouvaient être les restes de micro-organismes photosynthétiques anoxygéniques, chimiotrophes ou hétérotrophes, dont les équivalents modernes sont tous des Bactéries Gram-négatives ou des Archées.

Notamment en ce qui concerne *M. jannaschii*, cette étude a permis de montrer la bonne capacité des EPS à être rapidement silicifiés et à être préservés. En effet, ils ont servi de site pour la nucléation de la silice et ont été identifiés au sein du précipité de silice tout au long de la fossilisation expérimentale de *M. jannaschii*.

Ceci montre l'importance de la recherche de tous les types de produits microbiens dans les roches anciennes, et pas exclusivement des restes cellulaires. Les biofilms formés par les micro-organismes sont souvent de taille conséquente, et leur structure filamenteuse et souple se démarque nettement de la matrice rocheuse, ce qui rend leur repérage plus facile que celui de micro-organismes micrométriques (Westall *et al.*, 2006b).

Cette étude ouvre aussi un certain nombre de perspectives en ce qui concerne la recherche de la vie sur Mars. Il y a de plus en plus de preuves de la présence passée de grandes quantités d'eau liquide sur Mars, et par voie de conséquence, de l'existence, sur cette planète, de conditions environnementales favorables à l'apparition de la vie. Si la vie est apparue sur Mars, alors, il y a une forte probabilité pour que ces formes de vie aient été

préservés par fossilisation avec de la silice ou un autre minéral. Comme la surface de Mars n'a pas été exposée à des phénomènes métamorphiques ou tectoniques aussi intenses que ceux qui se sont produits sur Terre, les roches sédimentaires qui se sont formées sur Mars dans sa jeunesse n'y ont pas été détruites comme sur Terre et doivent vraisemblablement toujours y être présents dans les terrains du Noachien (3,8-3,5 Ga) qui recouvrent une grande partie des haut-plateaux de l'hémisphère sud. Ces roches sont des sédiments volcanoclastiques, des dépôts hydrothermaux ou évaporitiques. Les traces de vie silicifiées dans les sédiments volcanoclastiques terrestres datant de l'Archéen inférieur (Westall *et al.*, 2006a) représentent donc des bons analogues d'une éventuelle vie martienne. Les résultats des expériences menées au cours de cette étude sont donc très pertinents et a priori utiles pour la recherche de traces de vie non seulement dans les roches terrestres de l'Archéen inférieur mais aussi dans les sédiments martiens.

Les missions spatiales actuelles (*Mars Exploration Rovers*, *Mars Reconnaissance Orbiter*) cherchent à préciser la présence d'eau dans le passé, par la recherche et l'étude de la répartition des minéraux liés à l'eau, comme les phyllosilicates et ou les sulfates. Des analyses récentes, réalisées en orbite (Bishop *et al.*, 2008), ont ainsi permis de mettre en évidence la présence de silice hydratée à la surface, vraisemblablement formée en réponse à une activité hydrothermale. Dans une optique de la recherche de traces de vie, cela souligne l'utilité de l'amélioration de nos connaissances des processus de silicification dans les sources chaudes terrestres, à laquelle contribuent les résultats de la fossilisation expérimentale des tapis microbiens prélevés à Octopus Spring.

La prochaine mission européenne martienne, ExoMars (lancement prévu en 2013), aura spécifiquement pour objectif la recherche directe de traces d'une vie passée sur Mars. La recherche de microfossiles dans les roches martiennes pourra s'appuyer sur les connaissances sans cesse en progrès concernant l'apparition de la vie sur Terre, les microfossiles terrestres, et les mécanismes de fossilisation des micro-organismes.

## **Cinquième partie : Perspectives**

Lors de cette étude, de nombreux aspects ont été abordés pour la première fois, comme la fossilisation expérimentale des Archées ou le suivi de la dégradation et de la préservation de la matière organique au cours de la fossilisation. Les résultats obtenus ont apporté des informations précieuses pour l'amélioration de notre connaissance sur la fossilisation, tout en donnant également l'envie d'étudier plus en détail certains points particuliers, suggérant ainsi de nouvelles études.

### ***Amélioration de la compréhension des mécanismes de la fossilisation des Archées et des thermophiles.***

Dans la continuité de la mise évidence de la capacité des Archées à être fossilisées, il est nécessaire de poursuivre les études afin de clarifier les mécanismes et les processus mis en jeu lors de la fossilisation.

Ainsi, si notre étude a permis de montrer que la paroi des Archées peut fixer des nanoparticules de silice, elle n'a pas permis de préciser le rôle de la membrane et de la S-Layer dans cette fixation. Ainsi, il serait utile de procéder à l'inventaire et à la localisation des groupes fonctionnels présents sur la paroi des Archées, et de suivre leur comportement au cours de la fossilisation. Des études similaires ont déjà été menées sur la cyanobactérie *Calothrix sp.*, en faisant appel au rayonnement synchrotron (SR-FTIR, *synchrotron radiation Fourier-transform infra-red*), et ont permis de suivre la relation entre la gaine et la silice au cours de la fossilisation, et de montrer un épaissement de la gaine puis une accumulation de silice sur celle-ci (Benning *et al.*, 2004a, 2004b).

La fossilisation expérimentale des tapis microbiens prélevés à Octopus Spring ont également apporté beaucoup d'informations, mais ont montré qu'un mode opératoire plus élaboré et plus proche des conditions naturelles était nécessaire. Pour cela, il faut notamment simuler les écoulements de l'eau de la source, qui permettent un apport continu en silice. Il serait ainsi possible de simuler la silicification jusqu'à des stades proches de ceux qui ont été atteints dans les conditions naturelles, comme au Strokkur (Schultze-Lam *et al.*, 1995).

### **Etude de la réaction microbienne à l'injection de silice**

Cette étude a confirmé la présence, qui avait déjà été envisagée par Lalonde *et al.* (2005), de mécanismes actifs mis en œuvre par les cellules pour se protéger de la silicification. Des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier plus précisément et comprendre le fonctionnement de ces mécanismes.

Notre étude a suggéré que les cellules de *M. jannaschii* avaient produit d'importantes quantités d'EPS en réaction à l'ajout de silice, mais que ce n'était pas le cas pour *P. abyssi*. Toutefois, ni dans un cas ni dans l'autre, malgré de fortes présomptions, la production ou l'absence de production d'EPS n'a pu être prouvée avec certitude.

Il serait utile de poursuivre ces observations et de mener des études complémentaires pour identifier les micro-organismes capables de produire des EPS en réaction à la présence de silice. Une série d'analyses de la matière organique, limitée aux monosaccharides et aux acides aminés (les principaux constituants des EPS), couplées à des observations MEB seraient les moyens d'observations et d'analyses adéquats. Ils permettraient également de quantifier la production d'EPS et de suivre sa dynamique (temps de réaction des cellules à la présence de silice, fluctuations de la production par la suite). Nous avons vu que dans le cas de *Rhodovulum sp.* et de *M. jannaschii*, des quantités importantes d'EPS pouvaient être produites en moins de 24 heures. L'étude précise d'une dynamique de cette production d'EPS requerrait donc des analyses en continu, ou à pas de temps court (de l'ordre de l'heure par exemple).

De plus, les observations faites en microscopie électronique en transmission ont montré qu'à la fois *M. jannaschii* et *P. abyssi* avaient employé un mécanisme actif pour retenir la silice à une centaine de nanomètres autour de la cellule, empêchant ainsi pendant un certain temps la fixation de cette espèce minérale sur les parois. Lalonde *et al.* (2005) avaient également constaté un phénomène similaire dans les premiers temps de la fossilisation de *S. azorensis*. L'étude sur une sélection de micro-organismes permettrait de savoir si cette protection est récurrente chez les micro-organismes. Les mécanismes responsables cette répulsion demeurent inconnus. On peut seulement supposer qu'elle est le résultat de l'action de constituants de la paroi, mais qui restent à identifier.

Dans le cas de *M. jannaschii*, nous avons vu que, tandis que la silice était repoussée, le fer en solution pouvait sans problèmes et très rapidement se fixer sur la paroi des cellules, et pénétrer à l'intérieur du cytoplasme. Dans le cadre des études destinées à déterminer le rôle du fer dans la silicification, il serait intéressant de voir si la fixation préalable de fer sur la

paroi des cellules peut permettre à la silice de se fixer sur la paroi (par l'intermédiaire d'un pont cationique), en contournant ainsi, les mécanismes de protection.

### ***Etude de la préservation et de la dégradation de la matière organique***

L'étude d'une éventuelle préservation et/ou dégradation de la matière organique durant la fossilisation de *M. jannaschii* constituait une première approche de cet aspect du processus expérimenté. Par conséquent, en dépit de résultats mitigés, cette étude fut à la fois riche en enseignements et en perspectives pour de futurs travaux.

En préalable à de nouvelles études, il sera nécessaire de redéfinir les méthodes et de bien choisir les différentes souches de micro-organismes à utiliser. Une étude menée en parallèle avec plusieurs souches permettrait ainsi de comparer les résultats entre eux, et faciliterait grandement l'interprétation des résultats. Pour cette interprétation, il est également nécessaire de mener en parallèle des observations en microscopie électronique pour avoir au moins aperçu des phénomènes survenus au cours de la fossilisation.

Comme cela a été évoqué dans la discussion, il sera nécessaire de pouvoir déterminer sous quelle forme, et dans quelle types de structures cellulaires (paroi, cytoplasme, EPS) sont présentes les différentes molécules organiques. Cette information serait particulièrement précieuse et permettrait de déterminer l'état de la matière organique au terme de la fossilisation expérimentale, et donc de savoir quels composés microbiens (paroi, EPS) ont été les mieux préservés. En complément à l'utilisation du synchrotron, il serait également possible d'identifier précisément, de quantifier et de placer dans la chronologie de la silicification un certain nombre de mécanismes, comme une production d'EPS, une perte du contenu cytoplasmique, ou tout simplement de savoir si les cellules sont encore vivantes après le début de la fossilisation. Cela permettrait enfin de connaître précisément la dynamique de la fixation de silice sur les constituants organiques, tout en précisant le rôle de la silice dans la préservation des molécules organiques.

### ***Poursuite des études relatives à la fossilisation avec *P. abyssi* et *Geobacillus* sp.***

La fossilisation expérimentale de *P. abyssi* a montré que cette souche pouvait être un très bon sujet d'étude pour la poursuite des travaux concernant la silicification des Archées et des extrémophiles. A l'inverse de *M. jannaschii*, cette souche semble être plutôt résistante aux changements des conditions de milieu entraînés par la présence de silice. En outre, il est possible d'obtenir une grande quantité de cellules en fin de culture, ce qui est précieux pour

les observations, et notamment pour la réalisation de coupes ultrafines pour la microscopie électronique. Du fait du faible nombre de cellules de *M. jannaschii* obtenu en cultures, le repérage des cellules au MEB ou MET a été rendu difficile, alors que ce problème n'a pas été rencontré avec *P. abyssi*.

*P. abyssi* pourrait ainsi être utilisée pour un certain nombre d'études dans la continuité de celles menées avec *M. jannaschii*, comme l'étude la préservation et de la dégradation de la matière organique, ou l'adsorption de cations métalliques par une Archée.

Dans ce dernier cas, il serait ainsi possible de dresser un bilan complet avec *P. abyssi* de la fixation de différents ions métalliques sur la paroi des Archées. La plus grande densité cellulaire permettrait de mesurer plus précisément l'immobilisation des métaux par les cellules lors des mesures par spectrométrie par absorption atomique, et faciliterait les observations en microscopie électronique en transmission.

Toutefois certaines précautions devront être prises. En effet, un des avantages de *M. jannaschii* était son milieu de culture à la composition très simple, uniquement constitué de composés dissous. Dans le cas de *P. abyssi*, le soufre solide présent dans le milieu de culture pourrait être une source d'artefacts et de perturbations des analyses, et devrait donc être éliminé à la fin de la culture, et avant toute analyse.

Dans un cadre exobiologique, l'objectif final de ces études sur la fixation de cations métalliques sur la paroi des Archées est de vérifier si le fer peut jouer un rôle en facilitant la silicification, comme cela a déjà été suggéré pour les Bactéries (Ferris *et al.*, 1988 ; Fein *et al.*, 2002). Ce paramètre est d'importance dans la mesure où l'environnement naturel de *P. abyssi* (les fumeurs noirs) ou les sources chaudes contiennent, hormis la silice, de grandes quantités de substances minérales dissoutes qui sont aussi susceptibles de jouer un rôle dans la silicification.

La fossilisation de *P. abyssi* s'est faite selon une dynamique très lente, en raison du faible nombre de groupes fonctionnels disponibles sur la paroi. Après une exposition préalable à une solution riche en ions  $\text{Fe}^{3+}$ , le nombre de ces ions fixés sur la paroi pourrait être plus important que le nombre de groupes fonctionnels permettant une fixation directe de la silice. Du fait de la forte affinité entre ce fer et la silice, il est possible que la fixation de silice soit par conséquent plus rapide et plus importante.

Toutefois, le fait que *M. jannaschii* ait lysé au cours de la fossilisation, et les difficultés entraînées par la faible densité de cellules ne doivent pas décourager d'utiliser *M. jannaschii* lors des prochaines études concernant la fossilisation expérimentale des Archées.

En effet, au cours de cette étude, *M. jannaschii* nous a permis de faire des observations qu'il n'aurait sans doute pas été possible de faire avec des souches qui se fossilisent sans problème. Du fait de sa non-tolérance aux conditions de la fossilisation expérimentale, il a ainsi été possible d'observer les mécanismes actifs de protection mis en place par les cellules, ou de faire un premier suivi de la préservation de la matière organique après la lyse des cellules, permettant ainsi d'avoir un aperçu des possibilités de préservations des différentes molécules organiques sur le long terme. Par conséquent, *M. jannaschii* pourrait continuer à fournir des informations très intéressantes lors de futurs travaux.

De plus, pour mieux comprendre le mécanisme de la silicification, il est utile de connaître quels facteurs peuvent améliorer ou faciliter la fixation de la silice et la préservation des structures cellulaires, comme par exemple la fixation de fer en préalable à la silicification. Ainsi, la réussite d'une silicification et d'une préservation de cellules de *M. jannaschii* sous certaines conditions expérimentales serait utile pour l'identification et la compréhension de ces facteurs.

La fossilisation de *Geobacillus sp.* n'a pour l'instant été observée qu'en microscopie électronique à balayage, mais les quelques images obtenues ont suffi pour démontrer l'intérêt de poursuivre l'étude de la fossilisation de cette souche, comme représentante des Bactéries Gram positives thermophiles. Au delà des observations en microscopie électronique en transmission précédemment évoquées (cf. paragraphe 4.1.2.2), *Geobacillus sp.* (ou une souche équivalente) pourrait être associée à toutes les futures études qui ont été évoquées pour *P. abyssi*, comme l'étude la dégradation et de la préservation de la matière organique au cours de la fossilisation, ou l'étude de la fixation de métaux sur la paroi. Si l'adsorption d'ions métalliques par une Bactérie Gram-positive déjà été étudiée par Beveridge & Murray (1976), une étude associant *Geobacillus sp.*, *P. abyssi*, et une Bactérie Gram-négative permettraient de réellement comparer les taux d'adsorption d'espèces métalliques des différents types de micro-organismes.



## **Sixième partie : Conclusions**

*And in the end  
The love you take is equal to the love you make.*

The Beatles – The End

Cette étude, qui représente la première tentative de fossilisation expérimentale d'Archées, a donné des informations importantes pour la compréhension du processus de fossilisation des micro-organismes.

Elle a montré, avec la silicification des cellules de *P. abyssi*, que les Archées pouvaient être fossilisées expérimentalement dans des conditions proches de celles de l'Archéen inférieur (60°C, absence d'oxygène, [SiO<sub>2</sub>] = 500 ppm), et que leur silicification se faisait de manière comparable à celle des Bactéries Gram-négatives, observée lors de précédentes fossilisation expérimentales (Birnbaum *et al.*, 1989 ; Westall, 1997 ; Toporski *et al.*, 2002). Des nanoparticules de silice se fixent dans un premier temps sur la membrane tandis qu'une partie des cellules restent vivantes. Ensuite, les cellules sont progressivement recouvertes, sur une période de plusieurs mois, jusqu'à formation d'une fine couche de silice. Par la suite, et après la perte du contenu du cytoplasme, les particules de silice commencent à pénétrer à l'intérieur du cytoplasme et à remplir le vide créé à l'intérieur de la cellule.

*M. jannaschii* représente le premier cas observé de non-fossilisation d'un micro-organisme, même si des doutes avaient précédemment été émis sur ce sujet (Lalonde *et al.*, 2005), et montre qu'il peut y avoir de grandes différences de comportement entre deux souches plutôt similaires lors de la silicification. En revanche, lors de la fossilisation expérimentale de *M. jannaschii*, les EPS ont été très rapidement fossilisés et préservés jusqu'au terme de l'étude, avec conservation de leur morphologie fibreuse et réticulaire.

Les fossilisations des Bactéries *Rhodovulum sp.* et *Geobacillus sp.* ont une fois de plus montré la très bonne capacité des Gram-positives à être fossilisées, par comparaison avec les Gram-négatives, en raison d'un plus grand nombre et d'une meilleure disponibilité des groupes fonctionnels pouvant fixer la silice. La fossilisation est ainsi extrêmement efficace, et parvient à préserver des cellules mortes ou moribondes, ce qui n'est pas le cas pour les

## Conclusions

Bactéries Gram-négatives ou les Archées, où la fossilisation est incapable de préserver les cellules qui meurent rapidement.

Lors des fossilisations expérimentales menées sur des micro-organismes cultivés en laboratoire, la silice a polymérisé spontanément en quelques heures et formé un précipité blanchâtre au fond des flacons. Les cellules et les EPS ont semble-t-il joué un rôle passif dans la dynamique de cette polymérisation, en fournissant un support pour la nucléation des particules de silice et en permettant ainsi au précipité de se former sensiblement plus rapidement qu'en absence de micro-organismes. La silice a interagi sélectivement avec les cations dissous du milieu de culture, fortement avec le magnésium (ions  $Mg^{2+}$ ) et plus faiblement avec le sodium. Ces interactions ont modifié l'aspect et la composition du précipité de silice.

Cette étude a également permis d'identifier un certain nombre de mécanismes mis en œuvre par les cellules en réaction à la présence de silice à saturation dans leur environnement. Ces réactions étaient très nettes chez *M. jannaschii*, mais ont également été en partie observées pour *P. abyssi* ou *Rhodovulum sp.* Le mécanisme le plus communément observé est la répulsion des particules de silice, sans doute sous l'action de constituants de la paroi, qui est ainsi maintenue à une centaine de nanomètres de la paroi, et ne peut s'y fixer. Le détail de ce mécanisme reste inconnu. Dans certains cas, la production d'EPS par les cellules semble avoir également permis de tenir la silice à distance, grâce à une meilleure capacité des EPS à fixer la silice. Enfin, les cellules ont mis en place une régulation osmotique pour compenser la forte concentration en silice. Cette régulation a entraîné une déformation des cellules et, dans le cas des cellules les plus fragiles (*M. jannaschii*), a pu aboutir à leur lyse.

La reproductibilité et la validité des résultats ont été vérifiées par l'utilisation de différents modes opératoires qui ont tous abouti à la fossilisation des cellules de *P. abyssi*, et inversement à la lyse et la non-préservation des cellules de *M. jannaschii*. Cela a, au passage, permis de confirmer qu'une concentration en silice plus élevée permettait une meilleure préservation des cellules, sans pour autant que la minéralisation soit plus importante sur le long terme.

## Conclusions

Grâce à la complémentarité des observations en microscopie électronique et des analyses par spectrométrie par absorption atomique, il a été possible de montrer qu'une Archée (*M. jannaschii*) pouvait adsorber rapidement de nombreux cations métalliques ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ). Les ions Fer (III) se sont ainsi fixés sur la membrane plasmique et la S-Layer des cellules, et ont pénétré à l'intérieur du cytoplasme. La quantité de cations adsorbés semble toutefois bien inférieure à ce qui avait été observé chez les Bactéries Gram-positives ou Gram-négatives. La mise en évidence de la fixation de cations métalliques sur la paroi des Archées permettra de vérifier s'ils peuvent servir de site de fixation pour la silice, et ainsi permettre une meilleure silicification des Archées, comme cela a déjà été montré pour les Bactéries.

La fossilisation expérimentale des tapis microbiens prélevés à Octopus Spring a montré la complexité de l'étude d'un tapis microbien naturel, comparée à des cultures in vitro. La fossilisation des filaments de *Chloroflexus*, des autres micro-organismes présents, ainsi que des EPS du tapis a été initiée, avec des mécanismes et une chronologie similaires à ce qui avait été observé lors de fossilisations naturelles. Ceci justifie l'emploi de la fossilisation expérimentale pour la compréhension des processus naturels.

Si les observations en microscopie électronique n'ont pas montré une quelconque réaction microbienne à la présence de silice. Elles ont toutefois clairement montré le rôle important que joue la gaine fibreuse entourant les micro-organismes. En effet, celle-ci bloque les particules de silice, et empêche temporairement la silicification des cellules, leur permettant de survivre plus longtemps dans un environnement saturé en silice.

Le suivi de la préservation et de la dégradation de la matière organique au cours de la fossilisation expérimentale de *M. jannaschii* a permis de préciser et compléter les conclusions tirées des observations en microscopie électronique.

Parmi les composés analysés, les acides aminés sont les composés les mieux préservés, avec une composition finale presque identique à la composition initiale de la culture. Cela permet de dire que, contrairement à ce que suggérait la microscopie électronique, les EPS ne sont pas les seules structures organiques à avoir été préservées, et que cette préservation ne s'est pas faite en fonction de l'affinité des molécules organiques avec la silice. A l'inverse, les monosaccharides sont les composés qui ont été les plus affectés par la dégradation.

## Conclusions

Le précipité de silice qui s'est formé et densifié au cours de la fossilisation expérimentale semble avoir emprisonné les restes de cellules ainsi que les EPS présents dans le milieu et précipité par la silice, ce qui pourrait faciliter à terme leur préservation.

Si la forte augmentation de la quantité de matière organique durant les 24 premières heures semble confirmer une production d'EPS par les cellules en réaction à l'injection de la silice, la baisse presque immédiate de cette quantité et le détails des analyses laisse à penser que ces EPS n'ont pas été préservés.

Puisque les Archées peuvent être fossilisées à la manière des Bactéries Gram-négatives, il faut donc considérer que certains des microfossiles présents dans les roches anciennes puissent être des Archées. Toutefois, puisque tous les micro-organismes ne peuvent pas être fossilisés, et que certains types de micro-organismes, comme les Bactéries Gram-positives, sont plus rapidement fossilisés que d'autres, il faut considérer que ces microfossiles ne sont certainement pas représentatifs de l'ensemble de la communauté microbienne présente à l'origine.

La fossilisation rapide et efficace des EPS, illustrée dans le cas de *M. jannaschii* et des tapis microbiens prélevés à Octopus Spring, souligne le fait que la recherche de traces de vie dans des roches terrestres ou extraterrestres ne doit pas se concentrer uniquement sur la détection de restes de cellules, mais sur tous les types de produits microbiens.

Avec sans cesse de nouvelles données confirmant la présence passée d'eau à surface de Mars, et des signes d'une activité hydrothermale, les informations obtenues à partir de la fossilisation expérimentale pourraient être d'une aide précieuse pour la détection de possibles formes fossiles de vie martiennes.

## **Bibliographie**

Ahmad S, Scopes, RK, Rees GN, Patel BKC (2000) *Saccharococcus caldoxylosilyticus* sp. nov., an obligately thermophilic, xylose-utilizing endospore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, 517-523.

Allwood AC, Walter MR, Kamber BS, Marshall CP, Burch IW (2006) Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. *Nature*, **441**, 714-718.

Arouri K, Greenwood PF, Walter MR (1999) A possible chlorophycean affinity of some Neoproterozoic acritarchs. *Organic Geochemistry*, **30**, 1323-1337.

Arouri K, Greenwood PF, Walter MR (2000) Biological affinities of Neoproterozoic acritarchs from Australia: microscopic and chemical characterization. *Organic Geochemistry*, **31**, 75-89.

Bada JL, Glavin DP, McDonald GD, Becker L (1998) A search for endogenous amino acids in Martian meteorite ALH84001. *Science*, **279**, 362-365.

Balch WE, Wolfe RS (1976) New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **32**, 781-791.

Barghoorn ES, Tyler SA (1965) Microorganisms from the Gunflint chert. *Science*, **147**, 563-577.

Benning LG, Phoenix VR, Yee N, Tobin MJ (2004a) Molecular characterization of cyanobacterial silicification using synchrotron infrared micro-spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **68**, 729-741.

Benning LG, Phoenix VR, Yee N, Konhauser KO (2004b) The dynamics of cyanobacterial silicification: an infrared micro-spectroscopic investigation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **68**, 743-757.

Beveridge TJ, Murray RGE (1976) Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **127**, 1502-1518.

Beveridge TJ, Murray RGE (1980) Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **141**, 876-887.

Beveridge TJ, Koval SF (1981) Binding metals to cell envelopes of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **42**, 325-335.

Beveridge TJ, Fyfe WS (1985) Metal fixation by bacterial cell walls. *Canadian Journal of Earth Sciences*, **22**, 1892-1898.

Beveridge TJ (2001) Bacterial cell wall. In: *Encyclopedia of Life Science*. Nature Publishing Group, London. <http://www.els.net>

Beveridge TJ (2002) Archaeal cells. In: *Encyclopedia of Life Science*. Nature Publishing Group, London. <http://www.els.net>

Birnbaum SJ, Wireman JW, Borowski R (1989) Silica precipitation by the anaerobic sulphate reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* : effects upon cell morphology and implications for preservation. In : *Origin, evolution, and modern aspects of biomineralization in plants and animals* (ed Crick RE). Plenum Press, New York, pp. 507-516.

Bishop JL, McKeown NK, Prente M, Noe Dobrea EZ, Bibring J-P, Calvin WM, Ehlmann BL, Milliken RE, Mustard JF, Murchi SL, Poulet F, Roach LA, Weitz CM, and the CRISM Team (2008) Characterization of aqueous process on Mars through identification of phyllosilicates, sulfates and hydrated silica using CRISM hyperspectral images. *Geophysical Research Abstracts*, **10**, EGU2008-A-11529.

Borg LE, Connelly JN, Nyquist LE, Shih CY, Wiesmann HV, Reese Y (1999) The age of the carbonates in the Martian meteorite ALH84001. *Science*, **286**, 90-94.

Brasier MD, Green OR, Jephcoat AP, Kleppe AK, Van Kranendonk MJ, Lindsay JF, Steele A, Grassineau NV (2002) Questioning the evidence for Earth' oldest fossils. *Nature*, **416**, 76-81.

Brock TD (1978) *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. Springer-Verlag, New York.

Brocks JJ, Logan GA, Buick R, Summons RE (1999) Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science*, **285**, 1025-1026.

Buick R (1990) Microfossil recognition in Archean rocks: An appraisal of spheroids and filaments from a 3500 M.Y. old chert-barite unit at North Pole, Western Australia. *Palaios*, **5**, 441-459.

Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merrick JM, Glodek A, Scott JL, Geoghagen NS, Venter JC (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, **273**, 1058-1073.

Cady SL and Farmer JD (1996) Fossilization processes in siliceous thermal springs: trends in preservation along thermal gradients. *Ciba Found. Symp.*, **202**, 150-170.

Carson GA (1991) Silicification of fossils. In : *Taphonomy, releasing the data locked in the fossil record* (eds Allison PA, Briggs DEG). Plenum Press, New York, pp. 455-499.

Chan CS, De Stasio G, Welch SA, Girasole M, Frazer BH, Nesterova MV, Fakra S, Banfield JF (2004) Microbial polysaccharides template assembly of nanocrystal fibers. *Science*, **303**, 1656-1658.



Cody GD, Botto RE, Ade H, Wirick S (1996) The Application of Soft X-ray Microscopy to The In-Situ Analysis of Sporinite in Coal. *International Journal of Coal Geology*, **32**, 69-86.

De Ronde CEJ, Channer DMR, Kevin Faurec, Bray CJ, Spooner ETC (1997) Fluid chemistry of Archean seafloor hydrothermal vents: Implications for the composition of circa 3.2 Ga seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**, 4025-4042.

Defarge C, Trichet J, Jaunet A-M, Robert M, Tribble J, Sansone FJ (1996) Texture of microbial deiments revealed by Cryo-scanning electron microscopy. *Journal of Sedimentary Research*, **66**, 935-947.

Défarge C (1997) Apports du cryo-microscope electronique à balayage et du microscope électronique à balayage haute résolution à l'étude des matières organiques et des realtions naturelles. Exemples des sédiments microbiens actuels. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **324**, 553-561.

Disnar JR, Jacob J, Morched-Issa M, Lottier N, Arnaud F (2008) Assessment of peat quality by molecular and bulk geochemical analysis; application to the Holocene record of the Chautagne marsh (Haute Savoie, France). *Chemical Geology*, accepté.

Doemel WN, Brock TD (1977) Structure, growth, and decomposition of laminated algal-bacterial mats in alkaline hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, **34**, 433-452.

Dupraz C, Visscher PT, Baumgartner LK, Reid RP (2004) Microbe-mineral interactions: early CaCO<sub>3</sub> precipitation in a Recent hypersaline lake (Eleuthera Islands, Bahamas). *Sedimentology*, **51**, 745-765.

Erauso G, Reysenbach AL, Godfroy A, Meunier JR, Crump B, Partensky F, Baross JA, Marteinson V, Barbier G, Pace NR, Prieur D (1993) *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Archives of Microbiology*, **160**, 338-349.

Fein JB, Scott S, Rivera N (2002) The Effet of Fe on Si adsorption by *Bacillus subtilis* cell walls : insights into non-metabolic bacterial precipitation of silicate minerals. *Chemical Geology*, **182**, 265-273.

Ferris FG, Beveridge TJ (1986) Site specificity of metallic ion binding in *Escherichia coli* K-12 lipopolysaccharide. *Canadian Journal of Microbiology*, **32**, 52-55.

Ferris FG, Fyfe WS, Beveridge TJ (1988) Metallic ion binding by *Bacillus subtilis* : implications for the fossilization of microorganisms. *Geology*, **16**, 149-152.

Fortin D (2004) What biogenic minerals tell us. *Science*, **303**, 1618-1619.

Fortina MG, Mora D, Schumann P, Parini C, Manachini PL, Stackebrandt E (2001) Reclassification of *Saccharococcus caldoxylosilyticus* as *Geobacillus caldoxylosilyticus* (Ahmad *et al.*, 2000) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**, 2063-2071.

Francis S, Margulis L, Barghoorn ES (1978) On the experimental silicification of microorganisms. II. On the time of appearance of eukaryotic organisms in the fossil record. *Precambrian Research*, **6**, 65-100.

Fratesi SE, Lynch FL, Kirkland BL, Brown LR (2004) Effects of SEM preparation techniques on the appearance of bacteria and biofilms in the Carter Sandstone. *Journal of Sedimentary Research*, **74**, 858-867.

Garcia-Ruiz JM, Hyde ST, Carnerup AM, Christy AG, Van Kranendonk MJ, Welham NJ, (2003) Self-assembled silica-carbonate structures and detection of ancient microfossils. *Science*, **302**, 1194-1197.

Geslin C, Le Romancer M, Erauso G, Gaillard M, Perrot G, Prieur D (1996) PAV1, the first virus-like particle isolated from a hyperthermophilic Euryarchaeote, “*Pyrococcus abyssi*”. *Journal of Bacteriology*, **185**, 3888-3894.

Hanada S, Takaichi S, Matsuura K, Nakamura K (2002) *Roseiflexus castenholzii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, filamentous, photosynthetic bacterium that lacks chlorosomes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, 187-193.

Hanada S (2003) Filamentous anoxygenic phototrophs in hot springs. *Microbes and Environments*, **18**, 51-61.

Handley KM, Campbell KA, Mountain BW, Borwne PRL (2005) Abiotic-biotic controls on the origin and development of spicular sinter: in situ growth experiments, Champagne Pool, Waiotapu, New Zealand. *Geobiology*, **3**, 93–114.

Heaney PJ, Yates, DM (1998) Solution chemistry of wood silicification. *GSA Annual Meeting*, Abstract Program 30, A-375.

Herter S, Fuchs G, Baucher A, Eisenreich W (2002) A bicyclic autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathway in *Chloroflexus aurantiacus*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 20277-20283.

Iler RK (1979) *The Chemistry of Silica*. Wiley-Interscience, New York.

Johnson MR, Montero CI, Connors SB, Shockley KR, Bridger SL, Kelly RM (2005) Population density-dependent regulation of exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Molecular Microbiology*, **55**, 664-674.

Jones B, Renaut RW, Rosen MR (1998) Microbial biofacies in hot-spring sinters: a model based on Ohaaki Pool, North Island, New Zealand. *Journal of Sedimentary Research*, **68**, 413-434.

Jones B, Renaut, RW, Rosen MR (2001) Taphonomy of silicified filamentous microbes – implications for identification. *Palaaios*, **16**, 580-592.

Jones B, Renaut, RW, Rosen MR (2003) Silicified microbes in a geyser mound: The enigma of low-temperature cyanobacteria in a high-temperature setting. *Palaaios*, **18**, 87-109.

Jones B, Konhauser KO, Renaut, R, Wheeler R (2004) Microbe silicification in Iodine Pool, Waimangu geothermal area, North Island, New Zealand: Implications for recognition and identification of ancient silicified microbes. *Journal of the Geological Society of London*, **161**, 983-993.

Jones WJ, Leigh JA, Mayer F, Woese CR, Wolfe RS (1983) *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archives of Microbiology*, **136**, 254-261.

Kandler O, König H (1998) Cell wall polymers in Archaea. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **54**, 305-308.

Kasting JF (1993) Earth's early atmosphere. *Science*, **259**, 920-926.

Kazmierczak J, Altermann W (2002) Neoproterozoic biomineralization by benthic cyanobacteria. *Science*, **298**, 2351.

Kempe A, Wirth R, Altermann W, Stark RW, Schopf JW, Heckl WM (2005) Focused ion beam preparation and in situ nanoscopic study of Precambrian acritarchs. *Precambrian Research*, **140**, 36-54.

Knauth LP (1998) Salinity history of the Earth's earliest ocean. *Nature*, **395**, 554-555.

Knauth LP, Lowe DR (2003) High Archean climatic temperature inferred from oxygen isotope geochemistry of cherts in the 3.5 Ga Swaziland Supergroup, South Africa. *Geological Society of America Bulletin*, **115**, 566-580.

Knoll AH (1985) Exceptional preservation of photosynthetic organisms in silicified carbonates and silicified peats. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, **311B**, 111-122.

Konhauser KO, Ferris FG (1996) Diversity of iron and silica precipitation by microbial mats in hydrothermal waters, Iceland : implications for Precambrian iron formations. *Geology*, **24**, 323-326.

Konhauser KO, Phoenix VR, Bottrell SH, Adams DG, Head IM (2001) Microbial-silica interactions in Icelandic hot spring sinter : possible analogues for Precambrian siliceous stromatolites. *Sedimentology*, **48**, 415-433.

Kohnhauser KO, Jones B, Reysenbach AL, Renaut RW (2003) Hot Spring sinters : keys to understanding Earth's earliest life forms. *Canadian Journal of Earth Sciences*, **40**, 1713-1724.

Konhauser KO, Jones B, Phoenix VR, Ferris G, Renaut RW (2004) The microbial role in hot spring silicification. *Ambio*, **33**, 552-558.

König H (2001) Archaeal cell walls. In: *Encyclopedia of Life Science*. Nature Publishing Group, London. Vol. 2, pp. 161-168. <http://www.els.net>

Lalonde SV, Konhauser KO, Reysenbach AL, Ferris FG (2005) The experimental silicification of Aquificales and their role in hot spring formation. *Geobiology*, **3**, 41–52.

LaPaglia C, Hartzell PL (1997) Stress-Induced Production of Biofilm in the Hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3158-3163.

Lemelle L, Labrot P, Salomé M, Simionovici A, Viso M, Westall F (2008) In situ imaging of organic sulfur in 700–800 My-old Neoproterozoic microfossils using X-ray spectromicroscopy at the S K-edge. *Organic Geochemistry*, **39**, 188-202.

Leo RF, Barghoorn ES (1976) Silicification of wood. *Botanical Museum Leaflets. Harvard University*, **25**, 1-47.

Lowe DR (1980) Stromatolites 3,400-Myr old from the Archean of Western Australia. *Nature*, **284**, 441-443.

Lowe DR, Byerly GR (1986) Early Archean silicate spherules of probable impact origin, South Africa and Western Australia. *Geology*, **14**, 83-86.

Lowe DR (1994) Abiological origin of described stromatolites older than 3.2 Ga. *Geology*, **22**, 287-390.

Lowe DR, Byerly GR, Kytte FT, Shukulyukov A, Asaro F, Krull A (2003) Spherule beds 3.47-3.24 billion years old in the Barberton Greenstone Belt, South Africa : a record of large

meteoritic impacts and their influence on early crustal and biological evolution. *Astrobiology*, **3**, 7-48.

Madigan MT (2003) Anoxygenic phototrophic from extreme environments. *Photosynthetic research*, **76**, 157-171.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2003) *Brock: Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, Upper Saddle River.

Marshall CP, Javaux EJ, Knoll AH, Walter MR (2005) Combined micro-Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and micro-Raman spectroscopy of Proterozoic acritarchs: A new approach to Palaeobiology. *Precambrian Research*, **138**, 208-224.

Martinson VT, Moulin P, Birrien JL, Gambacorta A, Vernet M, Prieur D (1997) Physiological responses to stress conditions and barophilic behavior of the hyperthermophilic vent Archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 1230-1236.

McKay DS, Gibson Jr. EK, Thomas-Keprta KL, Vali H, Romanek CS, Clemett SJ, Chillier XDF, Maechling CR, Zare RN (1996) Search for Past Life on Mars: Possible Relic Biogenic Activity in Martian Meteorite ALH84001. *Science*, **273**, 924-930.

Mojzsis SJ, Arrhenius G, McKeegan KD, Harrison TM, Nutman AP, Friend RL (1996) Evidence for life on Earth before 3.800 million years ago. *Nature*, **384**, 55-59.

Mukhopadhyay B, Johnson EF, Wolfe RS (1999) Reactor-scale cultivation of the hyperthermophilic Methanarchaeon *Methanococcus jannaschii* to high cell densities. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 5059-5065.

Nesterchuk NI, Makarova TA (1970) The formation of aqueous magnesium silicate in the interaction of solutions of magnesium chloride and sodium metasilicate. *Russian Chemical Bulletin*, **19**, 2053-2055.

Nijman W, de Bruijne KH, Valkering M (1998) Growth fault control of Early Archean cherts, barite mounds and chert-barite veins, North Pole Dome, Eastern Pilbara, Western Australia. *Precambrian Research*, **88**, 25-52.

Oehler DZ, Robert F, Meibom A, Mostefaoui S, Selo M, Walter M, Sugitani K, Allwood A, Gibson EK (2007) NanoSIMS : new technology for assessing the origin of organic matter in Earth's oldest sediments. *2007 GSA Denver Annual Meeting*, Paper No. 166-6.

Oehler JH, Schopf JW (1971) Artificial microfossils: experimental studies of permineralization of blue-green algae in silica. *Science*, **174**, 1229-1231.

Oehler JH (1976) Experimental studies in Precambrian paleontology: structural and chemical changes in blue-green algae during simulated fossilization in synthetic chert. *The Geological Society of America Bulletin*, **87**, 117-129.

Olson JM (2006) Photosynthesis in the Archean Era. *Photosynthesis research*, **88**, 109-117.

Oyaizu H, Debrunner-Vossbrinck B, Mandelco L, Studier JA, Woese CR (1987) The green non-sulfur bacteria: a deep branching in the eubacterial line of descent. *Systematic and Applied Microbiology*, **9**, 47-53.

Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, **276**, 734-740.

Phoenix VR, Adams DG, Konhauser KO (2000) Cyanobacterial viability during hydrothermal biomineralization. *Chemical Geology*, **169**, 329-338.

Pierson BK, Castenholz RW (1974) A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. *Archives of Microbiology*, **100**, 5-24.

Rasmussen B (2000) Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. *Nature*, **405**, 676-679.



Reysenbach AL, Cady SL (2001) Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. *Trends in Microbiology*, **9**, 79-86.

Robert F, Chaussidon M (2006) A palaeotemperature curve for the Precambrian oceans based on silicon isotopes in cherts. *Nature*, **443**, 969-972.

Rosing MT (1999)  $^{13}\text{C}$  depleted carbon microparticles in >3700 Ma seafloor sedimentary rocks from West Greenland. *Science*, **283**, 674-676.

Rye R, Kuo PH, Holland HD (1995) Atmospheric carbon dioxide concentrations before 2.2 billion years ago. *Nature*, **378**, 603-605.

Schidlowski M (1988) A 3,800-million-year isotopic record of life from carbon in sedimentary rocks. *Nature*, **333**, 313-318.

Schopf JW, Packer BM (1987) Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science*, **237**, 70-73.

Schopf JW (1992) Paleobiology of the Archean. In : Schopf, J.W. and Klein, C., (Eds.), *The Proterozoic Biosphere*, Cambridge University Press, New York, 25-39.

Schopf JW (1993) Microfossils of the Early Archaean Apex Chert : new evidence of the antiquity of life. *Science*, **260**, 640-646.

Schopf JW (1999) *Cradle of Life: The Discovery of Earth's Earliest Fossils*. Princeton University Press, 336pp.

Schopf JW, Kudryavtsev AB, Agresti DG, Wdowiak TJ, Czaja AD (2002) Laser-Raman imagery of Earth's earliest fossils. *Nature*, **416**, 73-76.

Schultze-Lam S, Thompson JB, Beveridge TJ (1993) Metal ion immobilization by bacterial surfaces in freshwater environments. *Water Poll. Res. J. Canada*, **28**, 51-81.

Schultze-Lam S, Ferris FG, Kohnauser KO, Wiese RG (1995) In situ silicification of an Icelandic microbial mat : implications for microfossil formation. *Canadian Journal of Earth Sciences*, **32**, 2021-2026.

Schultze-Lam S, Fortin D, Davis B, Beveridge TJ (1996) Mineralization of bacterial surfaces. *Chemical Geology*, **132**, 171-181.

Score R (1997) The thrill of the search: Finding ALH84001. *The Planetary Report XVII*, 5-7.

Shields GA, Kasting JF vs. Robert F, Chaussidon M (2007) Palaeoclimatology: Evidence for hot early oceans? *Nature*, **447**, E1-E2.

Siever R, Scott RA (1963) Organic geochemistry of silica. In : *Organic Geochemistry* (ed Breger LA). Macmillan Co., New York, pp. 579-595.

Stefanova M, Disnar JR (2000) Composition and early diagenesis of fatty acids in lacustrine sediments, lake Aydat (France). *Organic Geochemistry*, **31**, 41-55.

Stetter KO (2006) Hyperthermophiles in the history of life. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **361**, 1837–1843.

Summons RE, Jahnke LL, Hope JM, Logan GA (1999) 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature*, **400**, 554-557.

Szostak JW (1999) Constraints on the sizes of the earliest cells. In : *Space Studies Board, Size Limits of Very Small Microorganisms: Proceedings of a Workshop*, National Research Council, National Academy Press, Washington DC.

Taylor AP, Barry JC (2004) Magnetosomal matrix: ultrafine structure may template biomineralization of magnetosomes. *Journal of Microscopy*, **213**, 180-197.

Tice MM, Lowe DR. (2004) Photosynthetic microbial mats in the 3,416-Myr-old ocean. *Nature*, **431**, 522-523.

Toporski JKW, Steele A, Stapleton D, Goddard DT (1999) Contamination of Nakhla by terrestrial microorganisms. In : *30rd Lunar and Planetary Science Conference*, LPI Contribution No. 1526, Lunar and Planetary Institute, Houston.

Toporski JKW, Steele A, Westall F, Thomas-Keprta KL, McKay DS (2002) The simulated silicification of bacteria – new clues to the modes and timing of bacterial preservation and implications for the search for extraterrestrial microfossils. *Astrobiology*, **2**, 1-26.

Treiman AH (2003) Submicron magnetite grains and carbon compounds in Martian meteorite ALH84001: inorganic, abiotic formation by shock and thermal metamorphism. *Astrobiology*, **3**, 369-392.

Tyler SA, Barghoorn ES (1954) Occurrence of structurally preserved plants in pre-cambrian rocks of the Canada shield. *Science*, **119**, 606-608.

Ueno Y, Yoshioka H, Maruyama S, Isozaki (2004) Carbon isotopes and petrography of kerogens in ca. 3.5 Ga hydrothermal silica dikes in the North Pole area, Western Australia. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **68**, 573-589.

van Kranendonk MJ, Webb GE, Kamber BS (2003) Geological and trace element evidence for a marine sedimentary environment of deposition and biogenicity of 3.45 Ga carbonates in the Pilbara, and support for a reducing Archean ocean. *Geobiology*, **1**, 91-108.

van Zuilen MA, Lepland A, Arrhenius A (2002) Reassessing the evidence for the earliest traces of life. *Nature*, **418**, 627-630.

Wahlund TM, Woese CR, Castenholz RW, Madigan MT (1991) A thermophilic green sulfur bacterium from New Zealand hot springs, *Chlorobium tepidum* sp. nov. *Archives of Microbiology*, **156**, 81-90.

Walsh MM (1992) Microfossils and possible microfossils from the Early Archean Onverwacht Group, Barberton Mountain Land, South Africa. *Precambrian Research*, **54**, 271-293.

Walsh MM (2004) Evaluation of early Archean volcanoclastic and volcanic flow rocks as possible sites for carbonaceous fossil microbes. *Astrobiology*, **4**, 429-437.

Walter MR, Bauld J, Brock TD (1972) Siliceous algal and bacterial stromatolites in hot springs and geyser effluents of Yellowstone National Park. *Science*, **178**, 402–405.

Walter MR, Buick R, Dunlop JSR (1980) Stromatolites 3,400-3,500 Myr old from the North Pole area, Western Australia. *Nature*, **284**, 443-445.

Walter MR (1983) Archean stromatolites : evidence of the Earth's earliest benthos. In : *Earth's Earliest Biosphere* (ed JW Schopf), Princeton University Press, Princeton, New Jersey, pp 187-213.

Ward DM, Ferris MJ, Nold SC, Bateson MM (1998) A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology*, **62**, 1353-1370.

Westall F, Boni L, Guerzoni E (1995) The experimental silicification of microorganisms. *Paleontology*, **38**, 495-528.

Westall F (1997) The influence of cell wall composition on the fossilization of bacteria and the implications for the search for early life forms. In: *Astronomical and Biochemical Origins and the Search for Life in the Universe* (eds Cosmovici C, Bowyer S, Werthimer D). Editori Compositrici, Bologna, pp. 491-504.

Westall F, Steele A, Toporski J, Walsh M, Allen C, Guidry S, McKay D, Gibson E, Chafetz H (2000) Polymeric substances and biofilms as biomarkers in terrestrial materials: implications for extraterrestrial samples. *Journal of Geophysical Research*, **105**, 24511–24527.

Westall F, de Wit MJ, Dann J, van der Gaast S, de Ronde CEJ, Gerneke D (2001) Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa. *Precambrian Research*, **106**, 93-116.

Westall F, Brack A, Barbier B, Bertrand M, Chabin A (2002) Early Earth and early life : an extreme environment and extremophiles – application to the search for life on Mars. *Proceedings of the Second European workshop on Exo/Astrobiology, Graz, Austria, 16-19 September 2002*, ESA SP-518, European Space Agency, Noordwijk, The Netherlands, pp. 131-136.

Westall F. (2003) The geological context for the origin of life and the mineral signatures of fossil life. In H. Martin, M. Gargaud, G. Reisse, B. Barbier (eds.) *The Early Earth and the origin of Life*. Springer, Berlin.

Westall F, Folk RL (2003) Exogenous carbonaceous microstructures in Early Archaean cherts and BIFs from the Isua greenstone belt: Implications for the search for life in ancient rocks. *Precambrian Research*, **126**, 313-330.

Westall F (2004) Early life on Earth : the ancient fossil record. In : *Astrobiology : future perspectives* (ed. Ehrenfreund P) Kluwer, Dordrecht, pp. 287-316.

Westall F, Oberger O, Rouchon V, Rouzaud J-N, Wright I (2004) On the identification of Early Archaean microfossils in cherts from Barberton and the Pilbara. In : *Field Forum on Processes on the Early Earth Abstract Volume, Kaapvaal Craton, 4-9 July 2004*, Univ. Witwatersrand, Johannesburg, South Africa, pp. 94-97.

Westall F, Southam G (2006) The early record of life. *Archean Geodynamics and Environments*, **164**, 283-304.

Westall F, de Vries ST, Nijman W, Rouchon V, Orberger B, Pearson V, Watson J, Verchovsky A, Wright I, Rouzaud JN, Marchesini D, Severine A (2006a) The 3.466 Ga “Kitty’s Gap Chert”, an early Archean microbial ecosystem. *Geological Society of America special paper*, **405**, 105-131.

Westall F, de Ronde CEJ, Southam G, Grassineau N, Colas M, Cockell C, Lammer H (2006b) Implication of a 3.472-3.333 Gyr-old subaerial microbial mat from the Barberton greenstone belt, South Africa for the UV environmental conditions on the early Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **361**, 1857-1875.

Whitman, WB (2001). "Genus I. *Methanocaldococcus* gen. nov.", in DR Boone and RW Castenholz, eds.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria*, 2nd ed., New York: Springer Verlag.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**, 4576-4579.

Xiong J, Fischer WM, Inoue K, Nakahara M, Bauer CE (2000) Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science*, **289**, 1724-1730.

Yee N, Phoenix VR, Konhauser KO, Benning LG, Ferris FG (2003) The effect of cyanobacteria on silica precipitation at neutral pH: implications for bacterial silicification in geothermal hot springs. *Chemical Geology*, **199**, 83-90.

Yura T, Nagai H, Mori H (1993) Regulation of the heat-shock response in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **47**, 321-350.

Zhang X, Bishop PL (2003) Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere*, **50**, 63-69.

## Fossilisation expérimentale de bactéries : appui à l'identification de signatures microbiologiques terrestres et extraterrestres

**Résumé :** Puisque les premières formes de vie connues à ce jour ( $> 3$  Ga) ont été préservées grâce à la précipitation de silice sur les structures cellulaires (silicification), nous avons mené la fossilisation expérimentale de différentes souches microbiennes (les Archées *Methanocaldococcus jannaschii* et *Pyrococcus abyssi*, les Bactéries *Chloroflexus aurantiacus* et *Geobacillus sp.*), représentatives des micro-organismes thermophiles, anaérobies et autotrophes qui auraient pu exister dans les conditions environnementales de la Terre primitive ou de Mars. Il s'agit de la première fossilisation expérimentale d'Archées, et l'une des toutes premières concernant des micro-organismes thermophiles.

La fossilisation expérimentale a été suivie en microscopie électronique (MEB, MET, Cryo-MEB) pour l'étude morphologique, et par des analyses chimiques (GC, GC-MS, HPLC) pour l'étude de la dégradation ou de la préservation de la matière organique durant la fossilisation.

Cette étude a montré que tous les micro-organismes ne pouvaient pas être silicifiés. Les cellules de *M. jannaschii* ont ainsi lysé rapidement tandis, qu'à l'inverse, celles de *P. abyssi*, *Geobacillus sp.* et *C. aurantiacus* ont été préservées, avec des intensités de la fossilisation variables selon les espèces. Les micro-organismes ont souvent mis en place des mécanismes actifs pour se protéger de la silicification, comme la production d'EPS, ou la répulsion de la silice. Ces résultats suggèrent que les différences entre espèces ont une forte influence sur le potentiel des différents micro-organismes à être préservés par la fossilisation.

Cette étude fournit un bon aperçu des processus de silicification et de préservation des types de micro-organismes qui auraient pu exister sur la Terre primitive. La connaissance de ces mécanismes peut être utile pour la recherche et l'identification de microfossiles dans les roches terrestres et extraterrestres, tout particulièrement dans le cas de Mars.

**Mots clés :** Archées, Bactéries, fossilisation, silice, matière organique, sources chaudes, Terre primitive, Mars.

## Experimental silicification of microorganisms. Applications in the search for evidence of life in early Earth and extraterrestrial rocks.

**Abstract :** Since the earliest life forms known to date ( $> 3$  Gyr) were preserved due to the precipitation of dissolved silica on cellular structures (silicification), we undertook an experiment to silicify several microbial species (the Archaea *Methanocaldococcus jannaschii* and *Pyrococcus abyssi*, and the Bacteria *Chloroflexus aurantiacus* and *Geobacillus sp.*), representative of anaerobic, thermophilic microorganisms that could have existed in the environmental conditions of early Earth and early Mars. This is the first time that Archaea have been used in a simulated fossilisation experiment and one of the very first fossilisations of thermophilic microorganisms.

The experimental fossilisation was monitored by electron microscopy (SEM, TEM, Cryo-SEM) for the morphological study, and by chemical analysis (GC, GC-MS, HPLC) for the study of the preservation or degradation of organic matter during silicification.

This experiment demonstrated that not all microorganisms silicify under the same conditions. *M. jannaschii* cells lysed rapidly, although the EPS (extracellular polymeric substances) were preserved, as opposed to *P. abyssi*, *Geobacillus sp.* and *C. aurantiacus* where the cells were preserved and fossilized with differing degrees of silicification between species. The microorganisms apparently used active mechanisms to protect themselves temporarily from silicification, such as EPS production or silica repulsion. These results suggest that differences between species have a strong influence on the potential for different microorganisms to be preserved by fossilisation.

This study provides valuable insight into the silicification and preservation processes of the kind of microorganisms that could have existed on the early Earth. Knowledge of these mechanisms can be helpful for the search and the identification of microfossils in both terrestrial and extraterrestrial rocks, and in the particular case of Mars.

**Keywords :** Archaea, Bacteria, fossilisation, silica, organic matter, hot springs, early Earth, Mars.



Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Rue Charles Sadron, 45071  
Orléans Cedex 02  
Institut de Sciences de la Terre d'Orléans, Bâtiment Géosciences,  
Université d'Orléans - BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2

